

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht - Karls - Universität

Heidelberg

vorgelegt von

Master of Science (M.Sc.) - Bianca Dimitrov

aus: Heidelberg (Baden-Württemberg)

Tag der mündlichen Prüfung: .....

Klinische, molekularbiologische und biochemische  
Charakterisierung eines neuen Patientendefekts im „ATPase  
*H<sup>+</sup>-transporting accessory protein 1*“ (ATP6AP1)-Gen

Gutachter: Prof. Dr. Sabine Strahl  
PD. Dr. Christian Thiel



## **Corrigendum zur Dissertation mit dem Thema:**

„Klinische, molekularbiologische und biochemische Charakterisierung eines neuen Patientendefekts im „ATPase H<sup>+</sup>-transporting accessory protein 1“ (ATP6AP1)-Gen“

vorgelegt von Bianca Dimitrov, 2017

In meiner Dissertation habe ich den zwar im Ergebnisteil 5.2.3 erwähnten Kollaborationspartner AG Wuhler (Leiden, Niederlande) irrtümlicherweise nicht in der Bildunterschrift von Abb.5.4. (S.56) aufgeführt. Anbei befindet sich der korrigierte Absatz.

5.2.3 Reduktion komplexer, sialylierter N-Glykane und Zunahme verkürzter, diantennärer Strukturen im Serum (S.55-56).

Die Bildunterschrift wurde wie folgt ergänzt:

**Abb.5.4.: N-Glykananalyse des Patientenserums im Vergleich zu männlichen Kontrollseren.** A) Positive Reflektron MALDI-TOF Massenspektrometrie mit den häufigsten Peaks des N-Glykoms von Kontrolle und Patient. B) Quantifizierung ausgewählter N-Glykane relativ zu den Kontrollen (gesetzt auf den Referenzwert 1) zeigte eine Anhäufung verkürzter, diantennärer Strukturen bei gleichzeitig vermindert vorliegenden sialylierten, komplex Strukturen. (Abbildung erstellt in Zusammenarbeit mit Agnes Hipgrave-Ederveen und Manfred Wuhler, Leiden, Niederlande.)

## Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung .....	1
2. Ziel der Dissertation .....	5
3. Einleitung .....	6
3.1. Proteinglykosylierung und ihre biologische Relevanz .....	6
3.2. Biosynthese von Glykoproteinen .....	6
3.3. N- und O-Glykosylierung .....	6
3.3.1. N-Glykosylierung .....	6
3.3.2. O-Glykosylierung vom Mucintyp .....	11
3.4. Angeborene Erkrankungen der Glykosylierung, die „Congenital Disorders of Glycosylation“ (CDG) .....	12
3.5. Intrazelluläre Regulation des pH-Werts .....	15
3.5.1. Struktur der vakuolären H <sup>+</sup> -ATPase (V-Typ H <sup>+</sup> -ATPase, V-ATPase). .....	15
3.5.2. Das humane, akzessorische Protein ATP6AP1 .....	19
4. Material und Methoden .....	21
4.1. Material .....	21
4.1.1. Patientenmaterial .....	21
4.1.2. Chemikalien .....	21
4.1.3. Enzyme und zugehörige Lösungen .....	23
4.1.4. Zellkulturmedien und Zusätze .....	23
4.1.5. Antikörper .....	24
4.1.6. Kits und Standards .....	25
4.1.7. Verbrauchsmaterialien .....	25
4.1.8. Geräte .....	26
4.1.9. Puffer, Lösungen und Zellkulturmedien .....	29
4.2. Methoden .....	31
4.2.1. Methoden zur Arbeit mit genomischem Material .....	31
4.2.2. Zellbiologische Methoden .....	39
4.2.3. Proteinbiochemische Methoden .....	43
5. Ergebnisse .....	50
5.1. Anamnese eines männlichen Patienten mit multiorganischem Krankheitsbild .....	50
5.2. Identifizierung eines N-Glykosylierungsdefekts vom CDG-Typ II .....	53

5.2.1.	Diagnose durch die isoelektrische Fokussierung des Serum-Transferrins.....	53
5.2.2.	Unauffällige isoelektrische Fokussierung des Apolipoprotein CIII .....	54
5.2.3.	N-Glykananalyse aus dem Serum zeigte abweichende Glykanwerte	55
5.2.4.	Abweichende mRNA-Expression einiger golgispezifischer Proteine .	56
5.3.	Molekularbiologische Untersuchungen der genetischen Mutation des CDG-Patienten.....	58
5.3.1.	„Whole Exome Sequencing“ identifizierte eine hemizygote Mutation im <i>ATP6AP1</i> -Gen.....	58
5.3.2.	Sanger-Sequenzierung bestätigte die Punktmutation im <i>ATP6AP1</i> -Gen.....	58
5.4.	Reduzierte <i>ATP6AP1</i> -Expression bei kontrollähnlicher Lokalisation.....	59
5.4.1.	Verringertes <i>ATP6AP1</i> -Signal im Western Blot .....	59
5.4.2.	Abgeschwächtes <i>ATP6AP1</i> -Immunofluoreszenzsignal bei kontrollähnlicher Lokalisation.....	60
5.4.3.	Verminderte mRNA-Expression von <i>ATP6AP1</i> .....	62
5.5.	Zelluläre Anomalien der <i>ATP6AP1</i> -defizienten Fibroblasten.....	63
5.5.1.	Verlangsamtes Zellwachstum bei verlängerter Proliferationszeit.....	63
5.5.2.	Veränderte Aminosäurewerte im Serum und Fibroblasten .....	64
5.5.3.	pH-Wert-abhängiger Anstieg des Mikrotubuli-assoziierten Proteins 1A/1B „light chain“ 3 im Western Blot .....	66
5.5.4.	Leicht erhöhtes Signal des Immunglobulin „heavy chain“ Bindeproteins im Western Blot.....	67
5.5.5.	Kontrollähnliches Signal des Hypoxie induzierten Faktors $\alpha$ im Western Blot .....	68
5.6.	Defekte in der peroxisomale $\beta$ -Oxidation der Patientenfibroblasten.....	69
5.6.1.	Reduziertes Signal der Acyl-CoA Oxidase 3 im Western Blot .....	69
5.6.2.	Verringerte Katalaseaktivität der Peroxisomen.....	69
5.7.	Metabolische Veränderungen im Serum und Fibroblasten des <i>ATP6AP1</i> -CDG Patienten.....	70
5.7.1.	Unterschiedliche Acylcarnitinwerte im Serum und Fibroblasten .....	70
5.7.2.	Zelluläre Anreicherung von Lipidtröpfchen .....	73
5.7.3.	Abweichende Lipidzusammensetzung in Patientenfibroblasten .....	74
6.	Diskussion .....	77

6.1. Multisystemisches Krankheitsbild bei Defekten innerhalb der V-Typ H <sup>+</sup> -ATPase .....	77
6.2. Ein CDG-Typ II N-Glykosylierungsdefekt verursacht durch ATP6AP1-Defizienz .....	80
6.3. Weitreichender Effekt der <i>ATP6AP1</i> -Mutation auf den Metabolismus des Patienten.....	83
6.3.1. Defekte, peroxisomale $\beta$ -Oxidation verursacht metabolische Auffälligkeiten .....	83
6.3.2. Veränderte Lipidhomöostase in Patientenfibroblasten.....	86
6.4. Ausblick.....	89
7. Literaturverzeichnis.....	92
8. Anhang .....	103
8.1. Die relative Verteilung aller N-Glykanspezies .....	103
8.2. <i>ATP6AP1</i> -cDNA.....	104
8.3. qRT-PCR Messwerte der Gene .....	105
8.4. Messergebnisse aller detektierten Aminosäuren und Acylcarnitine im Serum und Fibroblasten.....	106
8.5. Messergebnisse der detektierten Lipidspezies in Fibroblasten .....	110
Publikationsliste.....	112
Konferenzteilnahme .....	113
Danksagung .....	114

## Abkürzungsverzeichnis

° C	Grad Celsius
μ	mikro ( $1 \cdot 10^{-6}$ )
A	Amper
A	Adenin
Abb.	Abbildung
AC	Acylcarnitine
ACN	Acetonitril
ACOX3	Acyl-CoA Oxidase 3, Pristanoyl
ACS	American Chemical Society
AG	Arbeitsgemeinschaft
ALDH18A1	Aldehyde Dehydrogenase 18 Family Member A1
ALG3	Asparagine-Linked Glycosylation 3 Homolog
ALG6	Asparagine-Linked Glycosylation 6 Homolog
ALG8	Asparagine-Linked Glycosylation 3 Homolog
ALG9	Asparagine-Linked Glycosylation 9 Homolog
ALG10	Asparagine-Linked Glycosylation 10 Homolog
ALG12	Asparagine-Linked Glycosylation 12 Homolog
ALT	Alanin-Aminotransferase
AMP	Adenosinmonophosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ApoCIII	Apolipoprotein-CIII
ARO	Autosomal-Rezessiv vererbte Osteoporose
AS	Aminosäure
AST	Aspartat-Aminotransferase



ATIII	Antithrombin-III
ATP	Adenosintriphosphat
ATP7A	ATPase Copper Transporting Alpha
ATP13A2	ATPase Type 13A2
ATP6AP1 (AC45)	ATPase H <sup>+</sup> transporting Accessory Protein 1
ATP6AP2 (M8-9)	ATPase H <sup>+</sup> transporting Accessory Protein 2
ATP7B	ATPase Copper Transporting Beta
ATP6V0A2	ATPase H <sup>+</sup> Transporting V0 Subunit A2
ATP6V0A3	ATPase H <sup>+</sup> Transporting V0 Subunit A3
ATP6V0A4	ATPase H <sup>+</sup> Transporting V0 Subunit A4
ATP6V1A	ATPase H <sup>+</sup> Transporting V1 Subunit A
ATP6V1B1	ATPase H <sup>+</sup> Transporting V1 Subunit B 1
ATP6V1B2	ATPase H <sup>+</sup> Transporting V1 Subunit B 2
ATP6V1E1	ATPase H <sup>+</sup> Transporting V1 Subunit E1
BiP	Binding Immunoglobulin Protein
bp	Basenpaare
Bq	Becquerel
BSA	Bovines Serum Albumin
BZH	Biochemie-Zentrum Heidelberg
bzw.	beziehungsweise
B4GALT1	Beta-1,4-Galactosyltransferase 1
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
cAMP	Cyclic AMP
CCDC115	Coiled-Coil Domain Containing 115
CDG	Congenital Disorders of Glycosylation
cDNA	complementary DNA
Ci	Curie(1 Ci = 37·10 <sup>10</sup> Bq)
cm	Centimeter
CMP	Cytidinmonophosphat
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
COG5	Component Of Oligomeric Golgi

COX	Complex 5
Ct	Cytochrom-c-Oxidase
Cu <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Cycle Threshold
Da	Kupfer(I)-sulfat
DBP	Dalton ( $1,66053892 \cdot 10^{-27}$ kg)
ddH <sub>2</sub> O	D-Bifunktionales Protein
DKFZ	double-distilled water
dl	Deutsches Krebsforschungszentrum
DMEM	Deziliter
DMSO	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Desoxyribonukleosidtriphosphat
Dr.	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
dRTA	Doktor
ECL	distal Renale Tubuläre Azidose
EDTA	Enhanced Chemiluminescence
ER	Ethylendiamintetraessigsäure
ERGIC	Endoplasmatisches Retikulum
ESI	ER-Golgi Intermediate Compartment
Ex	Elektrosprayionisation
ExAC	Exon
EXT1/2	Exome Aggregation Consortium
FCS	Exostosin Glycosyltransferase 1/2
F-Primer	fetales Kälberserum
FUT4	Forward Primer
g	Fucosyltransferase 4
g	Erdbeschleunigung ( <i>g force</i> )
G	Gramm
GDP	Guanin
GFP	Guanosindiphosphat
GM130	Green Fluorescent Protein
GPI	<i>cis</i> -Golgi Matrix Protein
	Glycophosphatidylinositol

GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunden
H <sup>+</sup>	Proton
H <sub>2</sub> O	Wasser
HC	High Control
HCl	Chlorwasserstoff (Salzsäure)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HiF1α	Hypoxia Inducible Factor 1 Alpha Subunit
HILIC	Hydrophilic Interaction Chromatography
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRP	Horseradish Peroxidase
Hz	Hertz
ICC	Immunocytochemistry
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IF	Immunofluoreszenz
IgA	Immunoglobulin A
IgG	Immunoglobulin
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
l	Liter
L-	L-Form, Aminogruppe de Aminosäuren steht nach links
LC3 (MAP1LC3)	Microtubule-Associated Protein 1A/1B-Light Chain 3
LLO	Lipid Linked Oligosaccharide
m	Meter
m	milli (1*10 <sup>-3</sup> )

M	molar (mol pro Liter)
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mA	Milliamper
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization
MAN1B1	$\alpha$ -1,2-Mannosidase
MAF	Minor Allel Frequency
MCL	Medioclavicularlinie
ml	Milliliter
mol	molare Masse
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MEK	Methylethylketon
mg	Milligramm
MGAT1	N-Acetylglucosaminyltransferase I
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minuten
mM	Millimolar
MPI	Mannose-6-Phosphate Isomerase
MS	Massenspektrometrie
mU	Milliunit
n	nano ( $1 \cdot 10^{-9}$ )
n	Anzahl
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NGS	Next Generation Sequencing
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
No.	Numero
NP-40	Nonoxinol 40
NTP	Nukleotidtriphosphat
OD	Optische Dichte

OST	Oligosaccharyltransferase
p	Probability of error
p.	Protein
p.a.	pro analysis
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PBST	PBS mit Tween
PCR	Polymerase Chain Reaction
Pen	Penicillin
PFA	Paraformaldehyd
Pfu	Pyrococcus furiosus
PGM1	Phosphoglucomutase 1
pH	potentia Hydrogenii
PKA	Ras/cAMP/ProteinaseK
PLO	Protein Linked Oligosaccharide
PMM2	Phosphomannomutase 2
PNGase F	Peptide N-Glycosidase F
P5CS	Pyrrolin-5-Carboxylat-Synthetase
q	langer Arm eines Chromosoms
QC	Quality Control
qRT-PCR	quantitative Real-Time PCR
RAB7A	Ras-Associated Protein RAB7
RefSeq	Reference Sequence
RFP	Red Fluorescent Protein
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reactive Oxidative Species
R-Primer	Reverse Primer
rpm	revolutions per minute
RT	Reverse Transkription
RT	Raumtemperatur
<i>S. cerevisiae</i>	Saccharomyces cerevisiae
SD	Standard Deviation
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
sek	Sekunden

SLC35A1	Solute Carrier Family 35 Member A1
SLC35A2	Solute Carrier Family 35 Member A2
SLC35A3	Solute Carrier Family 35 Member A3
SLC35B2	Solute Carrier Family 35 Member B2
SLC35B3	Solute Carrier Family 35 Member B3
SLC35B4	Solute Carrier Family 35 Member B4
SLC35C1	Solute Carrier Family 35 Member C1
SLC35D2	Solute Carrier Family 35 Member D2
S/N	Signal Rausch Verhältnis
SOD	Zink-Speroxid-Dismutase
SPE	Solid Phase Extraction
SSR4	Signal Sequence Receptor Subunit 4
Strep	Streptomycin
ST3GAL2	ST3 Beta-Galactoside Alpha-2,3-Sialyltransferase 2
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris Aceton EDTA
TBS	Tris-Buffered Saline
TBST	TBS mit Tween
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Tf	Transferrin
TMEM199	Transmembranprotein 199
TOF	Time Of Flight
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units
u.a.	unter anderem
UDP	Uridindiphosphat
UK	United Kingdom
UV	Ultraviolett
V	Volt
VMA21	Vacuolar ATPase Assembly Factor
V-Typ	Vacuolar-Type
v/v	Volumen pro Volumen

	(Volumenverhältnis)
WES	Whole Exome Sequencing
w/v	Gewicht pro Volumen
X	X-Chromosom
$\alpha$	alpha
$\beta$	beta
$\Delta$	delta
$\mu\text{l}$	Mikroliter
$\mu\text{m}$	Mikrometer
$\mu\text{M}$	Mikromolar
$\mu\text{mol}$	Mikromol
%	Prozent

### Symbole und Abkürzungen zur Darstellung von Zuckern und Glykanstrukturen

Gal 	Galaktose
Glc 	Glukose
GlcNAc 	N-Acetylglucosamin
Man 	Mannose
NeuNAc 	Sialinsäure
Fuc 	Fukose
Dol 	Dolichol
P	Phosphat

### Aminosäuren

Ala (A)	Alanin
Arg (R)	Arginin
Asa	Argininosuccinat
Asp	Asparagin
Cit	Citrullin
Cys (C)	Cystein
Gln	Glutamin
Glu (E)	Glutaminsäure
Gly (G)	Glycin
Thr (T)	Threonin

Tyr (Y)	Tyrosin
His	Histidin
Hci	Homocitrullin
Lys (K)	Lysin
Leu/Ile (L)/(I)	Leucin/Isoleucin
Met (M)	Methionin
Orn	Ornithin
Phe	Phenylalanin
Pro (P)	Prolin
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
Val	Valin

**Acylcarnitine**

3HMG	3-Hydroxymethylglutaryl carnitin
C0	freies Carnitin
C2	Acetylcarnitin
C3	Propionylcarnitin
C3:1	Acrylylcarnitin
C4	Butyrylcarnitin
C5	Valeryl carnitin
C5:1	Tiglylcarnitin
C5OH+HMB	3-Hydroxyisovaleryl-/2-Methyl-3-Hydroxyacylcarnitin+ $\beta$ -hydroxy $\beta$ -Methylbutyrat
C6	Hexanoylcarnitin
C8	Octanoylcarnitin
C8:1	Octenoylcarnitin
C10	Decanoylcarnitin
C10:1	Decenoylcarnitin
C12	Dodecanoylcarnitin
C14	Tetradecanoylcarnitin
C14:1	Tetradecenoylcarnitin
C14OH	3-OH-Tetradecanoylcarnitin



C16	Hexadecanoylcarnitin
C16:1	Hexadecenoylcarnitin
C16OH	Hydroxyhexadecanoylcarnitin
C16:1OH	Hydroxyhexadecenoylcarnitin
C18	Octadecanoylcarnitin
C18:1	Octadecenoylcarnitin
C18OH	3-OH-Octadecanoylcarnitin
C18:1OH	3-OH-Octadecenoylcarnitin
C18:2	Octadecadienoylcarnitin
MeGlut	3-Methylglutarylcarnitin
MMA	Methylmalonylcarnitin
Glut	Glutarylcarnitin

**Lipide**

14:0	Myristinsäure
14:1	Myristoleinsäure
15:0	Pentadecansäure
16:0	Palmitinsäure
16:1	Palmitoleinsäure
16:2	Hexadecadiensäure
17:0	Margarinsäure
17:1	Heptadecensäure
18:1	Ölsäure/Elaidinsäure
18:2	Linolsäure
18:3	Linolensäure
19:1	Sterculiasäure
20:1	Gadoleinsäure
20:2	Eicosadiensäure
20:3	Eicosatriensäure
20:4	Arachidonsäure
20:5	Timnodonsäure
22:3	Docosatriensäure
22:4	Docosatetraensäure
22:5	Clupanodonsäure

22:6	Cervonsäure
CE-x:y	Cholesterylester - Anzahl der Kohlenstoffatome (x) : Anzahl der Doppelbindungen (y)
Cer	Ceramide
Chol	Cholesterin
DAG	Diacylglycerol
HexCer	Hexosylceramide
PA	Phosphatidsäure
P-x:y	Plasmalogen - Anzahl der Kohlenstoffatome (x) : Anzahl der Doppelbindungen (y)
PA O	Alkylphosphatidsäure
PC	Phosphatidylcholin
PC O	Alkylphosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin
PE O	Alkylphosphatidylethanolamin
PE P	Phosphatidylethanolamin Plasmalogen
PG	Phosphatidylglycerin
PG O	Alkylphosphatidylglycerin
PI	Phosphatidylinositol
PI O	Alkylphosphatidylinositol
PS	Phosphatidylserin
SM	Sphingomyelin
TAG	Triacylglycerol

## 1. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wird ein neuer Patient mit einem Defekt im „ATPase H<sup>+</sup>-transporting accessory protein 1“ (ATP6AP1) klinisch, molekularbiologisch und biochemisch charakterisiert. Bei ATP6AP1 handelt es sich um ein akzessorisches Protein der V-Typ H<sup>+</sup>-ATPase. Diese Protonenpumpe hat in der Zelle eine wichtige Aufgabe und dient dem Erhalt der pH-Wert-Homöostase.

Unser Patient zeigt neben weiteren, multiorganischen Symptomen, vor allem Cutis laxa, Pankreasinsuffizienz, Hepatosplenomegalie sowie Immundefizienz.

Durch „Whole exome sequencing“ wurde die neue, hemizygote Mutation c.542T>G (p.L181R) im X-chromosomalen *ATP6AP1*-Gen identifiziert, die zu einem generellen N-Glykosylierungsdefekt führte, was anhand des CDG-II Musters in der isoelektrischen Fokussierung des Serum-Transferrins gezeigt wurde. Massenspektrometrische Analysen der N-Glykane aus dem Serum ergaben eine Reduktion komplexer, sialylierter und einen Anstieg veränderter, dianterrärer Strukturen. Weiterhin resultierte die Mutation in einer verminderten ATP6AP1-Expression bei kontrollähnlicher Lokalisation des Proteins in den Fibroblasten.

In Patientenzellen konnten wir eine signifikant reduzierte Proliferation und damit einhergehend eine verlängerte Verdopplungszeit nachweisen, wobei weder ein Anstieg der Apoptose nachgewiesen werden konnte noch die mitochondriale  $\beta$ -Oxidation betroffen war. Metabolische Studien der Aminosäuren- als auch Acylcarnitinzusammensetzung ergaben im Patienten von den Kontrollen abweichende Werte, in Fibroblasten und dem Serum. Vor allem waren in den Fibroblasten die kurzkettigen Spezies der Acylcarnitine reduziert und die mittel- bis langkettigen (C14-OH bis C18) erhöht. Weiterhin wurde eine Anreicherung der sehr langen, gesättigten Fettsäuren, der Phytan- und Pristansäure, festgestellt. Aufgrund einer reduzierten Katalaseaktivität sowie ACOX3-Expression in den Peroxisomen, vermuteten wir einen ATP6AP1-abhängigen Einfluss auf die peroxisomale  $\beta$ -Oxidation der sehr langen, verzweigtkettigen Fettsäuren.

Massenspektrometrische Lipidanalysen zeigten neben einer signifikanten Reduktion von Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin einen signifikanten Anstieg von Cholesterol. Innerhalb der kleinen Lipidspezies wurde eine Minderung des

Hexosylceramids und ein Anstieg seines direkten Vorläufers Ceramid nachgewiesen, was auch hier eine generelle Fehlregulation der Lipide vermuten lässt.

Die durchgeführten Analysen erweitern die Kenntnisse zu diesem seltenen CDG-Typ und helfen die komplexe, klinische Charakteristik dieses neuen Patienten zu verstehen.

## Summary

Within this scientific work a patient with a defect in the ATPase H<sup>+</sup>-transporting accessory protein 1 (ATP6AP1) will be clinically, molecular-biologically and biochemically analyzed. This gene encodes for an accessory protein of the V-Type H<sup>+</sup>-ATPase which plays a crucial role in keeping the homeostasis of the cellular pH-value.

Our patient presents with a multiorgan phenotype where the most dominant symptoms are Cutis laxa, pancreas insufficiency, hepatosplenomegaly and immune deficiency. Whole exome sequencing revealed the new hemizygous mutation c.542T>G (p.L181R) in the X-chromosomal *ATP6AP1* gene, resulting in a general N-glycosylation defect which was confirmed by a CDG-II like pattern of serum transferrin in the isoelectric focusing. Mass spectrometry analysis of serum N-glycans showed a reduction of complex sialylated and an increase in truncated, diantennary structures. Furthermore, the mutation led to a decrease in ATP6AP1 expression but did not change protein localization in fibroblasts in comparison to the control.

In patient cells a significant decrease in proliferation time and within this a longer doubling time were measured, whereas neither an increase of apoptosis was detected nor mitochondrial  $\beta$ -oxidation was affected. Metabolic studies demonstrated altered amino acid and acylcarnitine levels in patient cells and serum in comparison to the control. Especially, a reduction of short-chain and an increase in middle- to long-chain (C14-OH to C18) acylcarnitines in fibroblasts was confirmed. An accumulation of the long-chain, saturated fatty acids, phytanic and pristanic acid, was seen, as well. Because of a lower catalase activity and ACOX3 expression in peroxisomes we suspected an ATP6AP1-dependent effect on peroxisomal  $\beta$ -oxidation of very long, branched fatty acids.

Mass spectrometry analysis of lipids showed in contrast to a significant decrease of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine a significant increase in cholesterol. In turn, the minor lipid species presented with less hexosyl ceramide and more of the direct precursor ceramide when comparing patient with control fibroblasts, demonstrating a general misregulation of lipid homeostasis.

These analyses widen the knowledge of this rare type of CDG and help to understand the complex clinical characteristics of this new patient.

## **2. Ziel der Dissertation**

Die Glykosylierung von Proteinen gehört mit zu den wichtigsten co- und posttranslationalen Modifikationen, um die Funktionalität der Glykoproteine zu gewährleisten. Treten angeborene Defekte innerhalb der Glykoproteinbiosynthese auf, so führt dies häufig zu einem schweren, multisystemischen Krankheitsbild der betroffenen Patienten, das unter dem Begriff „Congenital Disorders of Glycosylation“ (CDG) zusammengefasst wird.

Das Ziel dieser Arbeit ist die klinische, molekularbiologische und biochemische Charakterisierung eines neuen CDG-II Patienten. Mit Hilfe eines breiten Spektrums an Analysen, zur Überprüfung der N-Glykane, des Aminosäuren- und Acylcarnitinhaushalts sowie der Lipide in Fibroblasten und Serum des Patienten, soll die Pathophysiologie zu diesem CDG-Defekt aufgeklärt werden. Schließlich sollen die gewonnen Erkenntnisse zu unserem neuen Patienten es ermöglichen, diesen Erkrankungstyp von anderen Glykosylierungsdefekten zu differenzieren, sodass letztendlich schnellere Diagnosen der Patienten gestellt und möglicherweise sogar unterschiedliche Therapieansätze versucht werden können.

### **3. Einleitung**

#### **3.1. Proteinglykosylierung und ihre biologische Relevanz**

In der Natur erfüllen Kohlenhydrate, die Glykane, zahlreiche wichtige Funktionen. Die Glykosylierung, also das Verknüpfen der Kohlenhydrate mit Proteinen, gehört zu den co- und posttranslationalen Modifikationen, die in jedem Lebewesen, angefangen von Bakterien über Pflanzen und Tiere bis hin zum Menschen, stattfinden [1 – 3]. Die an ein Protein angehefteten Glykane sind notwendig für dessen Qualitätskontrolle, korrekte Faltung, Funktionalität und Lokalisation und erfüllen damit essentielle, biologische und physiologische Aufgaben. Diese Glykoproteine sind an allen lebenswichtigen Vorgängen wie Wachstum, Differenzierung, Organentwicklung, Signaltransduktion, Abwehr- und Entzündungsreaktionen und selbst an der malignen Entartung beteiligt. Innerhalb der Zelle sind sie ubiquitär verteilt und daher sowohl in den Organellen als auch in der Membran einer Zelle lokalisiert und sogar der extrazellulären Matrix [4 – 6].

#### **3.2. Biosynthese von Glykoproteinen**

Die Biosynthese von Glykoproteinen ist ein hoch konservierter Mechanismus, an dem zahlreiche Proteine wie Glykosyltransferasen, Transportproteine und Glykosidasen beteiligt sind [6]. Man unterscheidet grundsätzlich zwischen den großen Gruppen der N-Glykosylierung und der O-Glykosylierung sowie der seltenen C-Mannosylierung. Neben Glykoproteinen gibt es weiterhin noch Glykolipide, GPI-Anker und Glykosphingolipide [2, 3, 6]. Im folgenden Abschnitt wird jedoch nur auf die N- und O-Glykosylierung von Proteinen eingegangen.

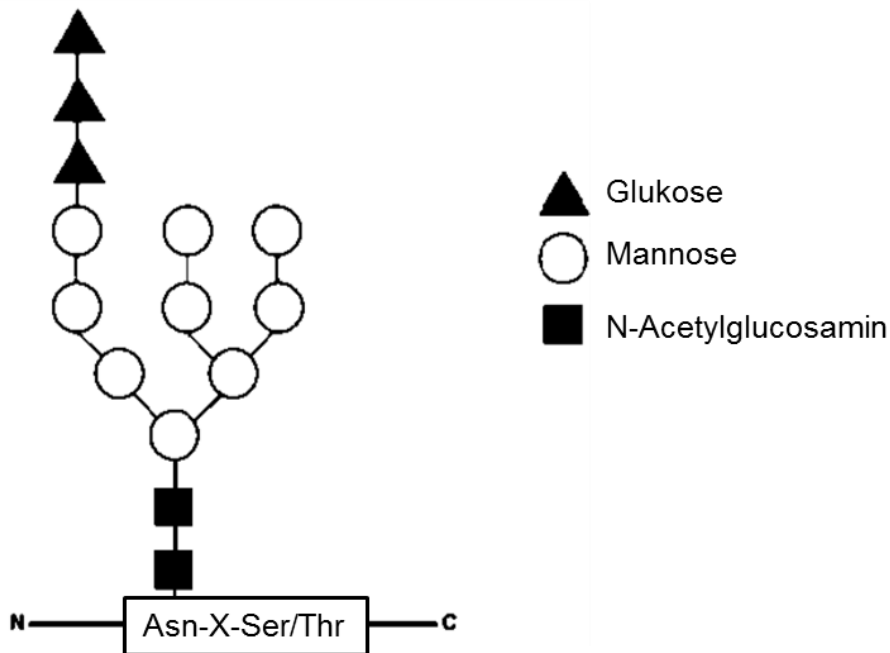
#### **3.3. N- und O-Glykosylierung**

##### **3.3.1. N-Glykosylierung**

Die Biosynthese N-glykosidisch verknüpfter Glykoproteine stellt neben der Phosphorylierung in eukaryotischen Zellen eine der häufigsten co- und posttranslationalen Modifikationen dar. Bei der Generierung neuer Glykoproteine



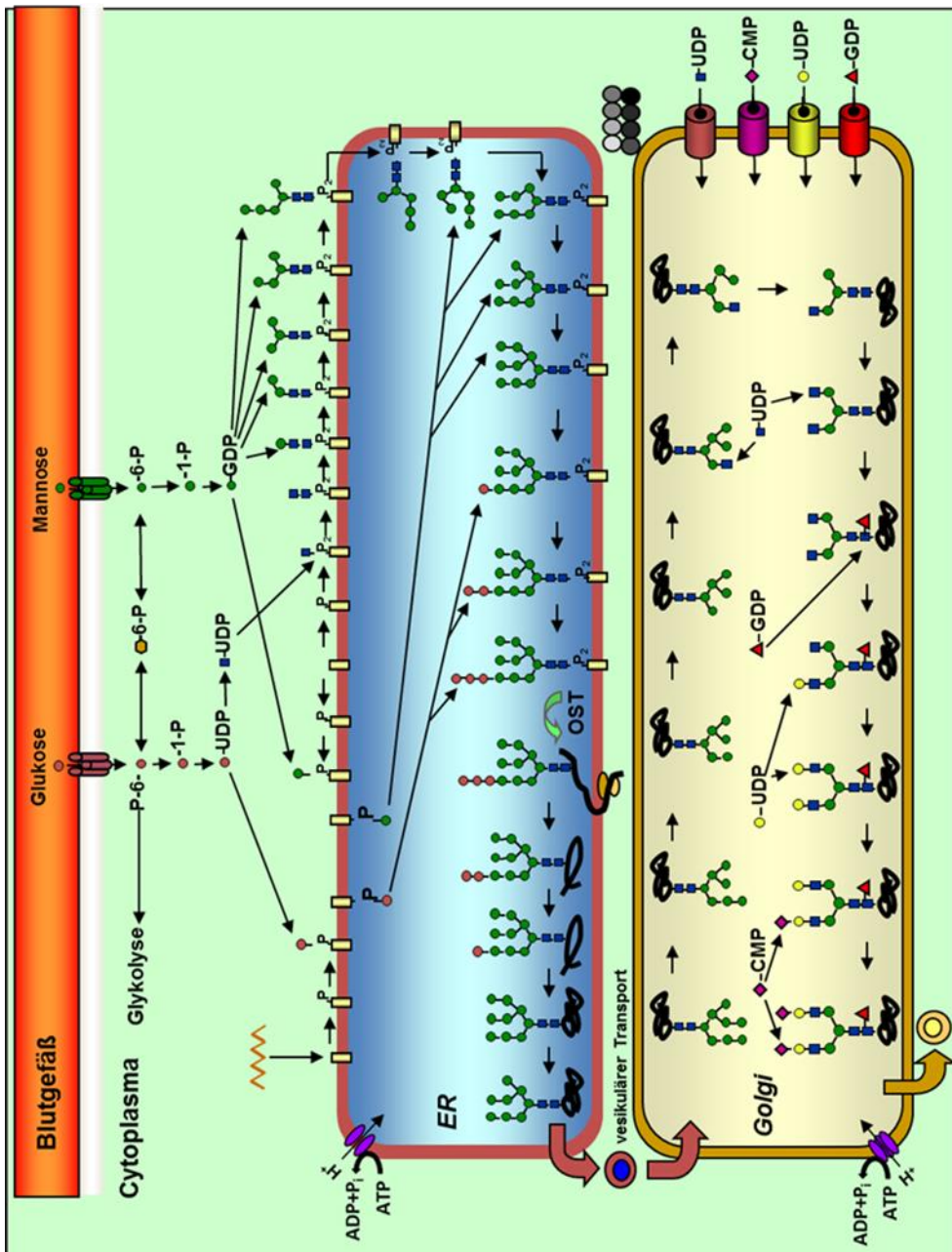
dient das spezifische Aminosäuremotiv Asn-X-Ser/Thr als Signal zur Anheftung der Kohlenhydratstrukturen an den entsprechenden Asparaginsäurerest (Asn) (Abb.3.1.). Das darauffolgende „X“ der Erkennungssequenz kennzeichnet dabei jede beliebige Aminosäure mit Ausnahme von Prolin. Anschließend folgt entweder ein Serin (Ser)- oder Threonin (Thr)-Rest. Allerdings wird nicht jede potentielle Erkennungssequenz tatsächlich auch mit Glykanen besetzt. Womöglich wird lediglich ein Drittel wirklich modifiziert [6 – 8].



**Abb.3.1.: Aminosäuremotiv der N-glykosidischen Bindung.** N-glykosidische Verknüpfung der Glykanstruktur an den Asparaginsäurerest (Asn) der spezifischen Erkennungssequenz Asn-X-Ser/Thr des neu synthetisierten Proteins, bestehend aus Asn, einer beliebigen Aminosäure „X“, außer Prolin, und Serin (Ser) oder Threonin (Thr) [8].

In Abb.3.2. ist die N-Glykoproteinbiosynthese in ihren einzelnen Schritten dargestellt. Diese beginnt im Cytoplasma und durchläuft das Endoplasmatischen Retikulum (ER) und den Golgi-Apparat [9 – 12]. Initial werden die hierfür benötigten Zucker UDP-Glukose (UDP-Glc), GDP-Mannose (GDP-Man), UDP-N-Acetylglucosamin (UDP-GlcNAc), CMP-Sialinsäure (CMP-Sia), UDP-Galaktose (UDP-Gal) und GDP-Fukose (GDP-Fuc) im Cytosol nukleotidaktiviert. Die Lipidkomponente Dolichol (Dol) wird über den Polyisoprenoid-Syntheseweg [11, 12] bereitgestellt und dient als Lipidträger für die zu generierende Oligosaccharidvorläuferstruktur im ER. Die Synthese der sogenannten „lipid-linked-oligosaccharides“ (LLOs) startet auf der cytosolischen Seite des ERs mit der Anheftung eines ersten phosphorylierten N-Acetylglucosaminrests an das zuvor phosphorylierte Dolichol. Nachfolgend werden ein weiterer N-Acetylglucosaminrest sowie fünf Mannosereste (Man) enzymatisch

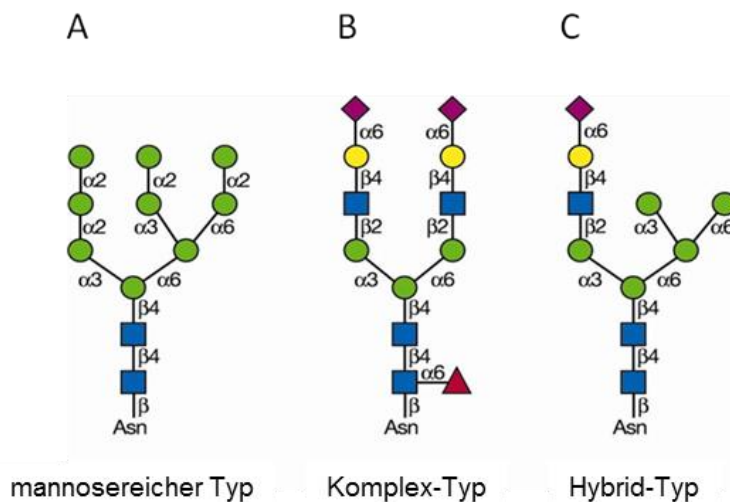
von den Zuckerdonoren UDP-N-Acetylglucosamin und GDP-Mannose übertragen, sodass  $\text{Man}_5\text{GlcNAc-PP-Dol}$  entsteht. Durch die Flippase wird nun die Zuckerstruktur ins Lumen des ER transloziert, wo sie enzymatisch durch die Mannosyl- (ALG3, ALG9, ALG12 und nochmals ALG9) und Glucosyltransferasen (ALG 6, ALG8 und ALG10) um weitere vier Mannose- und drei Glukosereste verlängert wird, wodurch letztendlich die vollständige  $\text{Dol-PP-GlcNAc}_2\text{Man}_9\text{Glc}_3$  Struktur gebildet wird. Schließlich überträgt die Oligosaccharyltransferase (OST), ein Multienzymkomplex aus acht Untereinheiten, das Oligosaccharid auf naszierende, neu synthetisierte Proteine, wobei hier der erste N-Acetylglucosaminrest der Zuckerstruktur  $\beta$ -glykosidisch mit der Amidgruppe eines Asparaginrests des neu synthetisierten Proteins verknüpft wird. Noch im ER werden zuerst ein, dann weitere zwei der drei Glukosereste durch die Glucosidase I und II (GS-I/II) abgespalten sowie ein Mannoserest über die  $\alpha$ -1,2-Mannosidase (MAN1B1). Die Abspaltung der Mannose erfolgt voraussichtlich nicht, wie schon oft in der Literatur beschrieben wurde im ER, sondern dem Golgi-Apparat, da dort die Lokalisation der endogenen Mannosidase von Rymen et al. 2013 [13] nachgewiesen wurde [10 – 12].



**Abb.3.2.: Die N-Glykoproteinbiosynthese lokalisiert im Cytoplasma, dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) und dem Golgi-Apparat.** Die Proteinbiosynthese beginnt mit der cytosolische Synthese eines Vorläuferoligosaccharids (Dol PP-GlcNAc<sub>2</sub>-Man<sub>5</sub>) am membranständigen Lipid Dolichol-Phosphat (■), durch Anlagerung von zwei N-Acetylglucosaminresten (■) und fünf Mannoseresten (●). Dieses lipidverknüpfte Oligosaccharid flippt anschließend ins ER, wo es um weitere vier Mannose- und drei Glukosereste (●) verlängert wird. Das so gebildete, vollständige Oligosaccharid (GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>9</sub>Glc<sub>3</sub>) wird von der Oligosaccharyltransferase (OST) erkannt und an definierte Asparaginreste naszierender Proteine gebunden. Die weitere Prozessierung des Glykoproteins findet anschließend im ER und danach im Golgi-Apparat statt. Durch Kürzungs- und Elongationsschritte werden die Glukosereste und weitere Mannosereste abgespalten und anschließend durch N-Acetylglucosamin-, Galaktose- (●), Fucose- (▲) und Sialinsäurereste (◆) verlängert. Letztendlich wird das gebildete Glykoprotein in Vesikel verpackt und zum entsprechenden Zielort transportiert (Abbildung erstellt von Christian Thiel).

Nach Faltung des Proteins durchläuft es die Qualitätskontrolle über die Chaperone Calnexin und Calreticulin und wird anschließend von Vesikeln zum Golgi transportiert. Hier entscheidet sich, ob Glykane des Hybrid-Typs, des

mannosereichen Typs oder des in Vertebraten am häufigsten vorkommenden Glykans, dem Komplex-Typ, ausgebildet werden [3, 6, 9]. Abb.3.3. stellt die drei Hauptglykan-Typen dar. Charakteristisch für die N-Glykanstrukturen ist nicht nur die Verknüpfung zum Asparaginrest des Proteins, sondern auch der Aufbau der Pentasaccharid-Kernstruktur des Glykans, (Man $\alpha$ 1-6(Man $\alpha$ 1-3)Man $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-Asn).



**Abb.3.3.3.: Die drei Hauptglykan-Typen der Asparaginsäure (Asn)-verknüpften Oligosaccharide.** Dargestellt sind der mannosereiche Typ (A), der Komplex- (B) und der Hybrid- Typ (C). Erkennbar ist auch die für alle N-Glykane charakteristische Pentasaccharid-Kernstruktur. Ebenfalls eingezeichnet ist die glykosidische Bindung, als  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Verknüpfung, einschließlich ihrer Ausrichtung [6].

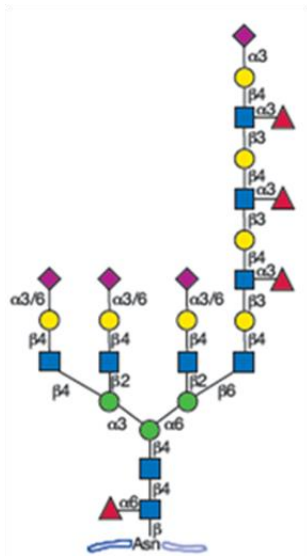
Im Falle des mannosereichen Typs (Abb.3.3.A) ist die restliche Struktur, bis auf zwei N-Acetylglucosamine, nur aus dem Zucker Mannose aufgebaut. Hierbei entkommt das intermediäre  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$  N-Glykan eines reifen Membran- oder sekretierten Glykoproteins entweder weiteren Modifikationen oder die Mannosidasaktivität und damit die Abspaltung weiterer Mannosereste wird angehalten [6].

In der Synthese des Komplex- und Hybrid-Typs stellt das  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$  N-Glykan des *cis*-Golginetzwerks das zentrale, intermediäre Produkt dar. Bei Generierung eines N-Glykans vom Komplex-Typ (Abb.3.3.B) wird  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$  von zwei weiteren Mannoseresten befreit und die Verzweigungen, gebildet von der Kernstruktur, mit je einem N-Acetylglucosaminrest verknüpft, gefolgt von jeweils einem Galaktose- und schließlich jeweils einem N-Acetylneuramisäurerest. Weiterhin können Fukosereste angehängt werden.

Betrachtet man den Hybrid-Typ (Abb.3.3.C), so ist die Kernregion auf Seiten des Man $\alpha$ 1-6-Arms nur aus Mannose aufgebaut, wohingegen auf der Man $\alpha$ 1-3-Seite sich ein bis zwei Antennen vergleichbar mit der Struktur des Komplex-Typs befinden [7,

9]. Stoppt die Prozessierung des GlcNAcMan<sub>4</sub>GlcNAc Zwischenprodukts mit dem Abbau eines weiteren Mannoserests an einem der Glykanarme und wird nur der andere weiter modifiziert, entsteht der Hybrid-Typ.

Schließlich sind zusätzliche Modifikationen des N-Glykans vom Komplex- und Hybrid-Typ möglich, was die Diversität um ein Vielfaches erhöht. Beispielsweise können die N-Glykanstrukturen durch Monosaccharide wie Fuc, Gal, GlcNAc und NeuNAc erweitert werden und weitverzweigte Strukturen bilden (Abb.3.4.) [6, 12].



**Abb.3.4.: Darstellung eines weitverzweigten N-Glykans in Vertebraten.** N-Glykan vom Komplex-Typ erweitert durch zusätzliche Monosaccharide [6].

### 3.3.2. O-Glykosylierung vom Mucintyp

Die O-Glykosylierung des Mucintyps gehört mit der N-Glykosylierung zu einer weit verbreiteten Proteinmodifikation. Mucine sind stark O-glykosylierte Proteine, welche vor allem in der mukösen Sekretion oder als extrazellulär herausragende Transmembranproteine zu finden sind. In diesem Fall gibt es keine spezifische Erkennungssequenz wie sie bei der N-Glykosylierung vorkommt. Daher grenzen die Glykosyltransferasen und Sulfotransferasen, verantwortlich für den Transfer einer Glukose- oder Sulfatgruppe, die vielen Möglichkeiten der O-Verknüpfung an Ser und Thr ein. Ein weiterer Unterschied ist, dass die Glykanstruktur der O-Gykane nicht zunächst auf einem Lipid synthetisiert und anschließend „en bloc“ auf das naszierende Protein übertragen werden, sondern dass die einzelnen Monosaccharide nacheinander direkt angebracht werden.

Die über ein O-verknüpftes N-Acetylgalactosamin (GalNAc) beginnende O-Glykosylierung des Mucintyps gehört zur ihrer häufigsten Form und findet überwiegend in den *cis*- bis *trans*-Kompartimenten des Golgi-Apparats

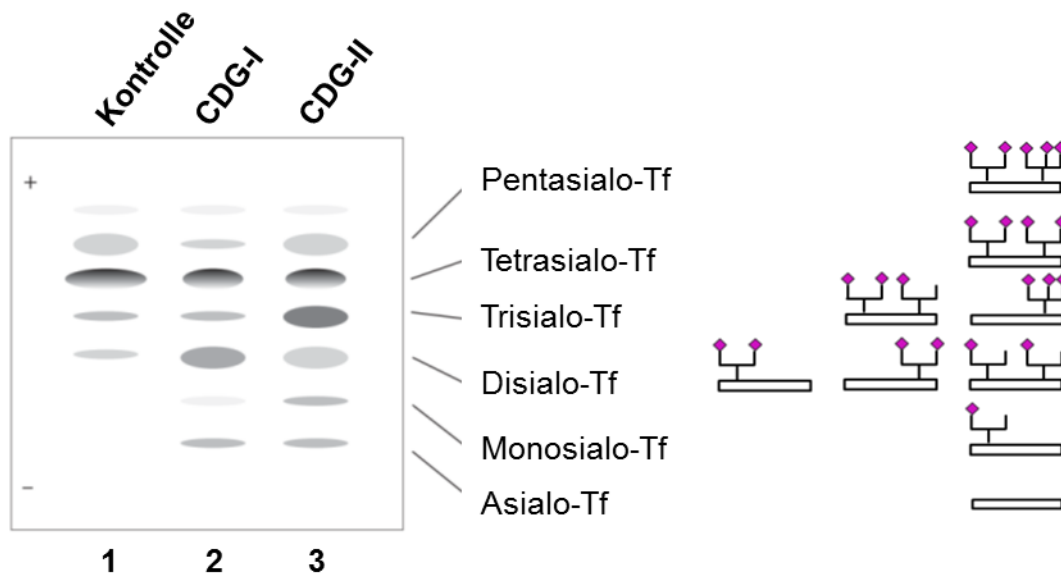
eukaryotischer Zellen statt [6]. Der erste Syntheseschritt im Golgi ist der Transfer des GalNAc-Rests vom Donor UDP-GalNAc auf Ser oder Thr des Proteins mittels einer der zahlreichen (mindestens 21) N-Acetylgalactosamintransferasen (GalNAcT1-21). Durch den Transfer der nächsten Zucker Gal und GlcNAc auf unterschiedliche Positionen des Kern- $\alpha$ -GalNAc-Rests entscheidet sich, welche Mucin O-Glykankernstrukturen ausgebildet werden. Weitere Monosaccharide, die angefügt werden können sind N-Acetylgalactosamin-, Galaktose- oder Sialinsäure-Reste in unterschiedlicher Anzahl. Terminale Strukturen der O-GalNAc Glykane können Fukose-, Galaktose-, N-Acetylglucosamin-, Sialinsäure- und N-Acetylgalactosamin-Reste sein [14 – 17].

### **3.4. Angeborene Erkrankungen der Glykosylierung, die „Congenital Disorders of Glycosylation“ (CDG)**

Treten angeborene Defekte in der Glykokonjugatbiosynthese auf so führt das meist zu einem multisystemischen Krankheitsbild mit schwerem Krankheitsverlauf. Neben psychomotorischer und neurologischer Retardierung zählen auch Gedeihstörungen, Koagulopathie, Dysmorphien, Krampfanfälle und schweren Organschäden zu den häufigen Symptomen bei der Erkrankungsgruppe „Congenital Disorders of Glycosylation“ (CDG) [18 – 20].

Mit Hilfe der isoelektrischen Fokussierung (IEF) des Serum-Transferrins, einem Markerglykoprotein der CDG-Diagnostik, lassen sich Defekte im N-Glykosylierungsweg in zwei Gruppen unterteilen, dem CDG-I und CDG-II Defekt [20, 21] (Abb.3.5.). Ein CDG-I Bandenmuster ergibt sich bei Störungen innerhalb des Cytoplasmas und des ERs bis einschließlich der Übertragung des dolicholverknüpften Oligosaccharids durch die Oligosaccharyltransferase (OST) auf das neu synthetisierte Protein. Solch ein früher Glykosylierungsdefekt ist oftmals durch Akkumulation verkürzter, lipidverknüpfter Oligosaccharide sowie die verminderte Bereitstellung von  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$  für die OST gekennzeichnet. Hierdurch können nicht alle erforderlichen Glykosylierungsstellen auf den Proteinen mit N-Glykanen besetzt werden. Demnach zeichnen sich hypoglykosylierte Proteine von CDG-I Patienten durch den Verlust ganzer Glykanketten aus. Ein CDG-II Erkrankungstyp liegt bei allen Defekten, die nach Übertragung der N-Glykane durch die OST auftreten vor und betreffen somit das

Trimmen und die Elongation der Zuckerketten im ER und im Golgi-Apparat. Charakteristisch hierfür ist, dass die N-Glykane auf den Glykoproteinen verkürzt vorliegen [22, 23].

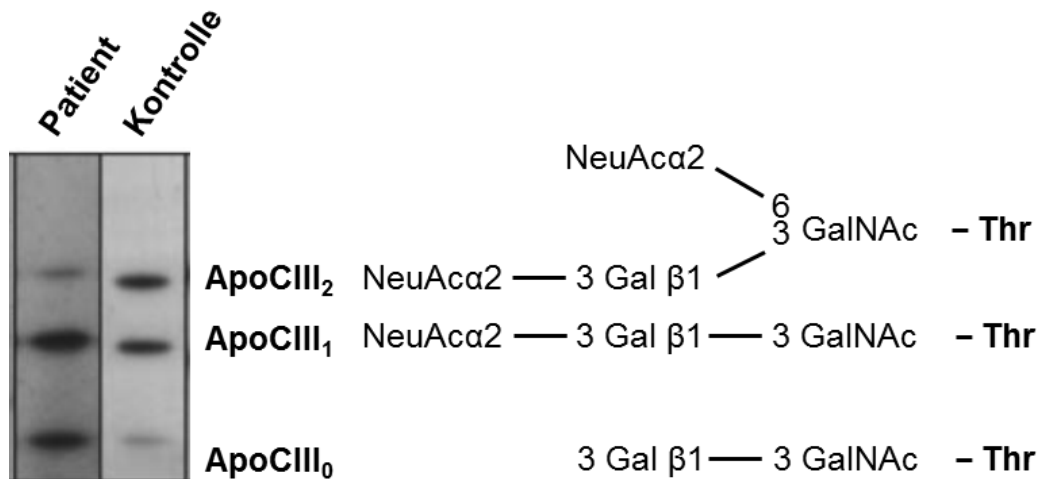


**Abb.3.5.: Schematische Darstellung des Laufmusters einer isoelektrischen Fokussierung (IEF) des Serum-Transferrins (Serum-Tf), einschließlich der bildlichen Darstellung der N-Glykosylierung der Transferrinisoformen.** Je nach Besetzung der zwei N-Glykosylierungsstellen des Markerglykoproteins Transferrin, sowie Vollständigkeit der Zuckerkette und damit das Vorhandensein der endständigen Sialinsäuren, unterscheidet man zwischen verschiedenen Transferrinisoformen, dem A-, Moni-, Di-, Tri-, Tetra- und Pentasialo-Tf. Die Kontrolle in Spur 1 (links) zeigt vor allem eine Bande des komplett glykosylierten Markerproteins, wohingegen im CDG-I Bandenmuster in Spur 2 (Mitte) im Vergleich Di- und Asialo-Tf erhöht sind und weniger des Tetrasialo-Tf zu finden ist. Typisch für ein CDG-II Muster in Spur 3 (rechts) ist eine Reduktion des Tetrasialo-Tfs und eine Umverteilung auf alle unvollständig glykosylierten Isoformen [23].

Zu berücksichtigen ist, dass es bei der Analyse des Serum-Transferrins von Neugeborenen bis zu einem Alter von drei Monaten zu falsch-positiven CDG-II Befunden kommen kann, da teilweise die Glykanstrukturen auf dem Transferrin noch nicht vollständig ausgebildet sind. Zur weiteren Abklärung sollte daher das N-glykosylierte Akute-Phase-Protein  $\alpha$ -1-Antitrypsin als Markerprotein bei Neugeborenen herangezogen werden, dessen N-Glykane bereits kurz nach der Geburt vollständig ausgeprägt sind. Obwohl hier aufgrund einer komplexeren Glykosylierung des Proteins nicht zwischen CDG-I oder CDG-II unterschieden werden kann, lässt sich aber zumindest feststellen, ob ein genereller Glykosylierungsdefekt vorliegt oder nicht [24].

Ebenfalls ermöglicht die Diagnose des Transferrins keine Aussage bezüglich eines Defekts in der O-Glykosylierung des Mucintyps, sodass hierfür Apolipoprotein-CIII (ApoCIII) herangezogen werden muss [25]. Das Protein trägt nur ein O-Glycan und kann im Plasma nachgewiesen werden. Es gibt drei verschiedene Isoformen

(ApoCIII<sub>0-2</sub>), die entweder zwei Sialinsäurereste (ApoCIII<sub>2</sub>), einen (ApoCIII<sub>1</sub>) oder keine Sialinsäurereste tragen (ApoCIII<sub>0</sub>). Ist die O-Glykosylierung nicht betroffen, werden in der IEF des ApoCIII vor allem die Isoformen ApoCIII<sub>2</sub> und ApoCIII<sub>1</sub> gleichermaßen detektiert, was sich im Falle eines O-Glykosylierungsdefekts in Richtung der ApoCIII<sub>0</sub> Isoform verschiebt (Abb.3.6.).



**Abb.3.6.: Schematische Darstellung des Laufmusters einer isoelektrischen Fokussierung (IEF) des Apolipoprotein CIII (ApoCIII) sowie die verschiedenen Isoformen.** Das Mucintyp O-Glykan Apolipoprotein CIII (ApoCIII) ist einfach O-glykosyliert. Es gibt drei Isoformen, die entweder zwei Sialinsäurereste (ApoCIII<sub>2</sub>), einen (ApoCIII<sub>1</sub>) oder keine Sialinsäurereste tragen (ApoCIII<sub>0</sub>). In der Kontrolle (rechts) werden vor allem ApoCIII<sub>2</sub> und ApoCIII<sub>1</sub> gleichermaßen detektiert. Ein Patient (links) mit O-Glykosylierungsdefekt weist eine Verschiebung in Richtung der ApoCIII<sub>0</sub> Isoform auf und eine Reduktion des ApoCIII<sub>2</sub> [25].

Seit der klinischen Erstbeschreibung eines Glykosylierungsdefekts (PMM2-CDG) im Jahr 1980 durch den belgischen Kinderarzt Jaak Jaeken [26] wurden mittlerweile über 100 weitere CDG-Defekte aufgeklärt [22, 27, 28]. Die Identifizierung neuer Defekte erfolgt seit mehreren Jahren mit stark steigender Tendenz, was vor allem in neu etablierten, genetischen Methoden wie dem „Whole-Exome-Sequencing“ (WES) oder dem „Next-Generation-Sequencing“ (NGS) begründet liegt. Damit gehören die CDG zu der am stärksten, wachsenden Gruppe monogenetisch vererbter Erkrankungen. Wie viele Patienten weltweit von Glykosylierungsstörungen betroffen sind, ist jedoch nicht bekannt. Initiiert von dem europäischen CDG-Forscherverbund, „EURO-CDG-2“, an dem auch unsere Arbeitsgruppe beteiligt ist, laufen momentan Studien, um zumindest für die Länder der Europäischen Union aktuelle Patientenzahlen zu erheben. Der Abschluss dieser Untersuchung ist für den Sommer 2017 geplant.

Auf Grundlage der seit 2009 eingeführten neuen Nomenklatur richtet sich die Benennung eines CDG-Typs nach dem jeweils betroffenen Protein in Verbindung mit



„-CDG“. Beispielsweise führt demnach ein Defekt in der Phosphomannomutase 2 (PMM2) entsprechend zu der Benennung PMM2-CDG [29].

Therapien mit Einfachzuckern wie Mannose, Fucose und Galaktose liegen für sehr wenige CDG-Defekte vor (MPI-CDG, PGM1-CDG, SLC35C1-CDG und SLC35A2-CDG) [30 – 35], sodass die meisten Patienten häufig nur rein symptomatisch behandelt werden können.

Der überwiegende Teil der Defekte innerhalb dieser Erkrankungsgruppe wird autosomal-rezessiv vererbt. Ausnahmen bilden die CDG-Typen ATP6AP1 („ATPase H<sup>+</sup>-transporting accessory protein 1“)-, ALG13 („UDP-N-acetylglucosaminyltransferase“)-, SLC35A2 („solute carrier family 35 member A2“)- und SSR4 („signal sequence receptor subunit 4“)-CDG, die gonosomal auf dem X-Chromosom lokalisiert sind, sowie die beiden dominant vererbten EXT1/2 („exostosin glycosyltransferase 1/2“)-CDG [22, 23].

### **3.5. Intrazelluläre Regulation des pH-Werts**

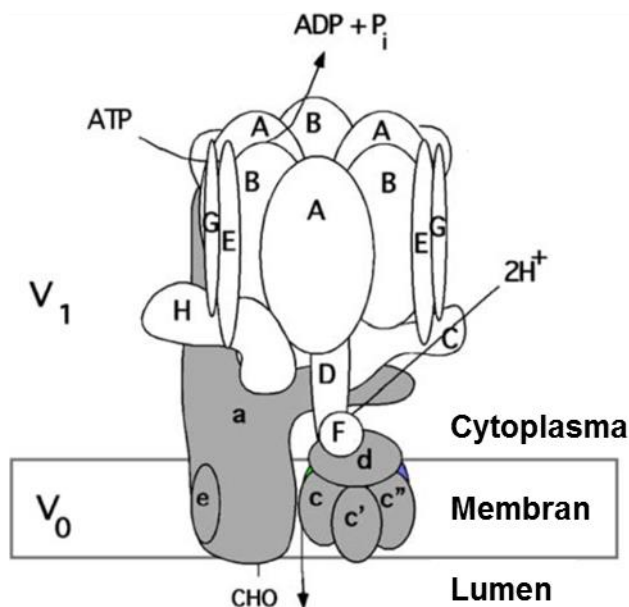
Fast alle zellulären Prozesse sind von der Aufrechterhaltung und der Regulation ihres entsprechend notwendigen pH-Werts abhängig, wodurch die Funktionalität und damit das Überleben der Zelle gesichert wird. Die Aufrechterhaltung der pH-Homöostase im Cytoplasma und den intrazellulären Kompartimenten wie ER, Golgi-Apparat, Mitochondrien, Lysosomen und Vesikeln ist daher essentiell. Eine Vielzahl von Regulationsmechanismen sind daran beteiligt den pH-Wert zu kontrollieren, wobei einerseits direkt Protonen transportiert werden können und andererseits ihr Transfer indirekt an andere Ionentransporte gekoppelt werden kann. Auch ATP (Adenosintriphosphat)-getriebene Protonenpumpen wie die vakuoläre H<sup>+</sup>-ATPase (V-Typ H<sup>+</sup>-ATPase, V-ATPase), eine ATP-abhängige Protonenpumpe, tragen wesentlich zum Aufbau des pH-Gradienten innerhalb der Zelle bei [26, 27].

#### **3.5.1. Struktur der vakuolären H<sup>+</sup>-ATPase (V-Typ H<sup>+</sup>-ATPase, V-ATPase)**

Die ATP-abhängige Protonenpumpe ist ein Multiuntereinheitenkomplex mit einem Molekulargewicht von circa 900 kDa. Dieses Protein wird nahezu in jeder eukaryotischen Zelle exprimiert und nutzt dabei die Energie aus der ATP-Hydrolyse für einen aktiven Transport von Protonen über Zellmembranen. Wichtig ist ihre Funktion als Protonenpumpe beispielsweise beim Membrantransport, der

Proteindegradation, Infektion durch Viren oder Toxine, Knochenresorption, Erhalt des pH-Wert-Gleichgewichts und sogar bei der Tumorzellinvasion. Ebenfalls reguliert sie die rezeptorvermittelte Endozytose und den intrazelluläre Transport lysosomaler Enzyme. Sie gehört aufgrund des ähnlichen, strukturellen Aufbaus zur gleichen Klasse der Membranpumpen wie die  $F_0F_1$  ATP Synthasen (F-Typ-ATPasen), welche man in Eubakterien, Mitochondrien und Chloroplasten findet [38 – 41]. Diese Klasse unterscheidet sich aufgrund ihres Aufbaus aus zwei Multiuntereinheiten-Domänen von den anderen.

Die humane V-Typ  $H^+$ -ATPase setzt sich aus der integralen  $V_0$  Domäne, die den Protonentransport durchführt und der cytosolischen  $V_1$  Domäne, welche für die ATP-Hydrolyse verantwortlich ist, zusammen (Abb.3.7.). Die  $V_1$ -Domäne des Menschen besteht aus acht Untereinheiten und insgesamt 13 Isoformen (A, B1, B2, C1, C2, D, E1, E2, F, G1, G2, G3, H), von denen D und F einen Rotor bilden und A und B1/2 ein Hexamer formen, welches ATP binden kann. Verknüpft sind die  $V_1$ - und  $V_0$ -Domäne über einen zentralen sowie einen peripheren, sogenannten, Stiel. Der periphere Stiel der  $V_1$ -Domäne setzt sich aus den Untereinheiten D und F zusammen. Betrachtet man nun  $V_0$ , so besteht diese Domäne aus fünf Untereinheiten und neun Isoformen (a1, a2, a3, a4, d1, d2, c, c' und e), von denen d1, d2, c und c' einen Ring, den Rotor, bilden [38]. Die weiteren, anderen Untereinheiten beteiligen sich an der Ausbildung des zentralen Stiels. So treibt die Energie aus der ATP-Hydrolyse durch das Hexamer, den Ring der  $V_1$ -Domäne, die Rotation des zentralen Stiels an, was wiederum den membranständigen Ring der  $V_0$ -Domäne rotieren lässt. Hierdurch können dann Protonen aus dem Cytoplasma in das Lumen eines Kompartiments transloziert werden [39 – 41].



Eukaryotic V-ATPase			
V <sub>1</sub> V <sub>0</sub>			
Human		Yeast	
Subunit isoform	Gene	Subunit isoform	Gene
<b>V<sub>1</sub> sector</b>			
A	ATP6V1A	A	VMA1
B1	ATP6V1B1	B	VMA2
B2	ATP6V1B2	–	–
C1	ATP6V1C1	C	VMA5
C2	ATP6V1C2	–	–
D	ATP6V1D	D	VMA8
E1	ATP6V1E1	E	VMA4
E2	ATP6V1E2	–	–
–	–	–	–
F	ATP6V1F	F	VMA7
G1	ATP6V1G1	G	VMA10
G2	ATP6V1G2	–	–
G3	ATP6V1G3	–	–
H	ATP6V1H	H	VMA13
<b>V<sub>0</sub> sector</b>			
a1	ATP6V0A1	a	VPH1/STV1
a2	ATP6V0A2	–	–
a3	ATP6V0A3	–	–
a4	ATP6V0A4	–	–
d1	ATP6V0D1	d	VMA6
d2	ATP6V0D2	–	–
c	ATP6V0C	c	VMA3
–	–	c'	VMA11
c''	ATP6V0B	c''	VMA16
e	ATP6V0E	e	VMA9
<b>Accessory subunits</b>			
Ac45	ATP6VAP1	–	–
M8-9	ATP6VAP2	–	–

**Abb.3.7.:** Schematische Darstellung des Multiuntereinheitenkomplexes der H<sup>+</sup>-ATPase, ihren Domänen und Untereinheiten, einschließlich einer Tabelle mit den humanen Isoformen. Die V-Typ H<sup>+</sup>-ATPase setzt sich zusammen aus der peripheren V<sub>1</sub> Domäne und der integralen V<sub>0</sub> Domäne, welche über einen zentralen (D, F) und einen peripheren Stiel (C, E, G, H, a) miteinander verbunden sind. Die ATP-Hydrolyse am Hexamer der V<sub>1</sub>-Domäne führt zu einer Rotation des zentralen Stiels, wodurch Protonen durch Drehung des membranständigen Rings (c, c', c'') vom Cytoplasma ins Lumen transportiert werden. Die Hefe hat im Gegensatz zur humanen Protonenpumpe keine Isoformen, sowie akzessorische Proteine. Ein weiterer Unterschied sind die drei „c“-Untereinheiten der Hefe, von denen human nur c und c' bekannt sind [38, 41].

Vor allem im Modellorganismus der Hefe wurden die ersten Erkenntnisse zur Struktur und den Eigenschaften der H<sup>+</sup>-ATPase gewonnen [42] (Abb.3.7.). Es wurde ebenfalls gezeigt, dass die beiden Domänen, V<sub>0</sub> und V<sub>1</sub>, in der Zelle nach Bedarf assembliert und deassembliert werden können, wodurch die V<sub>1</sub>-Aktivität gesteuert wird. Hierfür ist auch keine Neusynthese der Untereinheiten notwendig, sondern lediglich ihre pH-abhängige Regulation. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass dieser Prozess durch zahlreiche Faktoren und Signalwege reguliert werden kann, wie beispielsweise den Ras/cAMP/Proteinkinase A (PKA)-Weg oder die Erhöhung des pH-Werts über den neutralen Bereich hinweg im Falle der Assemblierung oder die Verhinderung der Deassemblierung durch Erhalt eines neutralen pH-Werts [40, 41, 43]. Im Gegensatz zur Hefe besteht die V<sub>0</sub>-Domäne beim Menschen nicht nur aus fünf Untereinheiten, sondern auch aus akzessorischen Proteinen wie dem „ATPase H<sup>+</sup>-transporting

accessory protein 2“ (ATP6AP2, M8-9) und dem „ATPase H<sup>+</sup>-transporting accessory protein 1“ (ATP6AP1, AC45). Letzteres soll ebenfalls die Aktivität der H<sup>+</sup>-ATPase regulieren, indem es den Transport der Protonenpumpe zu spezifischen, subzellulären Kompartimenten leitet [38, 40].

Mutationen in verschiedenen Untereinheiten des H<sup>+</sup>-ATPase-Komplexes führen vermutlich, aufgrund der essentiellen Aufgabe der Protonenpumpe für die pH-Homöostase und dementsprechend der korrekten Funktionalität intrazellulärer Prozesse, zu Erkrankungen (Tab.3.11), die häufig mit einer schweren Symptomatik einhergehen. Mittlerweile konnten hierbei bereits Mutationen innerhalb der ATP6V0A2-, ATP6AP1-, ATP6V1A- und ATP6V1E1-Untereinheiten auch mit einem bei den betroffenen Patienten vorliegenden Glykosylierungsdefekt in Zusammenhang gebracht werden [44 – 47].

**Tab.3.1.: Mutationen in Untereinheiten der V-Typ H<sup>+</sup>-ATPase und dem dazugehörigen Krankheitsbild.** Defekte der Untereinheiten ATP6V0A2, ATP6V1A und ATP6V1E1 führen neben einem häufig auftretenden, multiorganischen Phänotyp in den Patienten auch in manchen Fällen zu einem CDG-II N-Glykosylierungsdefekt und/oder O-Glykosylierungsdefekt. Analysen Betroffener mit Defekten innerhalb der ATP6V1B1-, ATP6V1B2-, ATP6V0A3-, ATP6V0A4-, ATP6AP2- und ATP13A2-Untereinheiten in Bezug auf einen möglichen Effekt auf die Proteinglykosylierung sind nicht bekannt oder wurden noch nicht untersucht [44 – 47].

<u>Gen</u>	<u>Krankheitsbild</u>
<i>ATP6V1B1</i>	Taubheit, renale tubuläre Azidose
<i>ATP6V1B2</i>	DOOR (Deafness, Osteodystrophy, Onychodystrophy, mental Retardation)-Syndrom, Zimmermann-Laband-Syndrom
<b><i>ATP6V0A2</i></b>	Cutis laxa Typ II/ „Wrinkly Skin“ Syndrom, N-Glykosylierungsdefekt CDG-II
<i>ATP6V0A3</i>	defekte Knochenresorption, autosomal rezessive Osteoporose mit neuronaler Degeneration
<i>ATP6V0A4</i>	defekte Harnsäuresekretion, renale tubuläre Azidose
<i>ATP6AP2</i>	X-chromosomal verknüpfte Parkinson Krankheit mit Spastik, hederatype geistige Retardierung
<i>ATP13A2</i>	Kufor-Rakeb Syndrome, Parkinson Krankheit

<b><i>ATP6AP1</i></b>	Immunsystem-Anomalie, Hepatopathie, N- und O-Glykosylierungsdefekt CDG-II
<b><i>ATP6V1A</i></b>	Cutis laxa, Gesichtsdysmorphien, Herz-Lungen und neurologische Auffälligkeiten, N-Glykosylierungsdefekt CDG-II
<b><i>ATP6V1E1</i></b>	Cutis laxa, N-Glykosylierungsdefekt CDG-II

Im folgenden Abschnitt wird weiter auf das akzessorische Protein ATP6AP1 (AC45) eingegangen. Im weiteren Verlauf beschränke ich mich auf die Bezeichnung ATP6AP1.

### 3.5.2. Das humane, akzessorische Protein ATP6AP1

Wie schon im vorigen Absatz erwähnt, setzt sich die V-Typ  $H^+$ -ATPase in Säugerzellen nicht nur aus unterschiedlichen Proteinen der V0- und V1-Komponenten, sondern auch aus zwei zusätzliche akzessorischen Untereinheiten, zusammen. Ihre Funktion und Struktur sowie genaue Interaktion mit der Protonenpumpe sind jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt. Bei den akzessorischen Proteinen handelt es sich um ATP6AP1 und ATP6AP2, deren Gene auf dem X-Chromosom lokalisiert sind [38]. Das akzessorische Protein ATP6AP1, ein 45 kDA Polypeptid, soll lumenal mit dem Ring aus d1/2, c und c“ der V0-Domäne und möglicherweise ebenfalls mit der Untereinheit a3 interagieren. Weiterhin zeigten elektronenmikroskopische Aufnahmen, dass ATP6AP1 mittels einer einzelnen  $\alpha$ -Helix seines C-Terminus in der Membran verankert ist [48, 49].

Das Protein wird ubiquitär exprimiert, am höchsten in neuronalen und endokrinen Zellen sowie Osteoklasten, mehrkernige Zellen, die im Knochenmark entstehen. Seine Lokalisation innerhalb der Zelle beschränkt sich in Leberzellen, den Hepatozyten, vor allem auf den frühen sekretorischen Weg, das ER und das ER-Golgi-Intermediär-Kompartiment (ERGIC), wohingegen ATP6AP1 in neuroendokrinen Zellen vor allem nahezu nur im ER lokalisiert zu sein scheint [47, 50]. Weiterhin wurde in neuroendokrinen Zellen aus dem Krallenfrosch *Xenopus laevis* gezeigt, dass es an der Regulation der Aktivität der  $H^+$ -ATPase beteiligt sein soll. Dies erfolgt angeblich durch Navigation der Protonenpumpe zu spezifischen Kompartimenten des sekretorischen Wegs, was die Notwendigkeit von ATP6AP1 für

den Erhalt des pH-Werts in genau diesen Kompartimenten belegen soll [51]. In Osteoklasten der Maus sowie in humanen Prostatakrebszellen konnte zusätzlich gezeigt werden, dass ATP6AP1 an der korrekten Navigation der V-Typ  $H^+$ -ATPase während der Bildung Clathrin-umhüllter Vesikel und auch der Clathrin-vermittelten Endozytose, hin zur und weg von der Plasmamembran, beteiligt sein soll. In Mausosteoklasten führte ein *ATP6AP1*-Knockdown zu einer Beeinflussung des lysosomalen Transports und der Exozytose, einschließlich eines Einflusses auf die Differenzierung der Osteoklastvorläuferzellen, ihre Heranreifung, der Knochendemineralisation und folglich der Knochenresorption [48, 52].

Die zelltypspezifisch variierende Lokalisation des ATP6AP1-Proteins in Zusammenhang mit der Vielzahl an möglichen Funktionen deutet darauf hin, dass es auch gewebespezifisch unterschiedlich glykosyliert und womöglich auch prozessiert werden kann. In jedem Fall scheint es eine essentielle Rolle innerhalb des Komplexes der Protonenpumpe und nachfolgend der Funktionalität von Proteinen der einzelnen Zellkompartimente und demnach ihrer Prozesse zu spielen.

## 4. Material und Methoden

### 4.1. Material

#### 4.1.1. Patientenmaterial

Die Studie wurde in Anlehnung an die Erklärung von Helsinki durchgeführt und vom Ethikkomitee der Medizinischen Fakultät Heidelberg genehmigt. Eine handschriftlich informierte Einwilligung wurde von den Eltern des Patienten für die Exomsequenzierung erhalten. Ebenfalls gestatteten die Eltern die molekularen Tests (Sanger-Sequenzierung) ihres eigenen *ATP6AP1*-Status.

#### 4.1.2. Chemikalien

<u>Chemikalien</u>	<u>Hersteller</u>
2-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
6-Aminocaproic acid, $\geq 99\%$ (titration), powder	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Acridinorange, "Acridine Orange hemi (zinc chloride) salt"	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
30 % Acrylamid / 0,8 % Bisacrylamid	Carl Roth Karlsruhe, Deutschland
Albumin bovine Fraction V, pH 7.0	Serva, Heidelberg, Deutschland
Ammoniumperoxodisulfat $\geq 98\%$ , p.a., ACS	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau, ACS, Reag. Ph Eur	Merck, Darmstadt, Deutschland
Calciumchlorid, entwässert, gepulvert, rein 95 %	Merck, Darmstadt, Deutschland
cOmplete, EDTA-free protease Inhibitor	Roche, Basel, Schweiz
Copper(II) sulfate pentahydrate, suitable for cell culture, $\geq 98\%$ , powder	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dimethylsulfoxid, getrocknet (max. 0,025 % H <sub>2</sub> O)	Merck, Darmstadt, Deutschland
di-Natriumhydrogenphosphat-Dodecahydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dodecylsulfat, Na-salt in Pellets	Serva, Heidelberg, Deutschland

Essigsäure 100 %, p.a.	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol $\geq$ 99,8 %, p.a.	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol, vergällt, $\geq$ 99,8 %, mit ca. 1 % MEK	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid - Lösung 1 %	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Ethylendiamin-tetraessigsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dinatriumsalz Dihydrat, $\geq$ 99 %, p.a., ACS	
Formaldehyd 4 %	Merck Darmstadt, Deutschland
Gelatine, gepulvert, reinst	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Glycerin, wasserfrei, p.a.	neoLab, Heidelberg, Deutschland
Glycin, $\geq$ 99 %	Roth, Karlsruhe, Deutschland
HEPES $\geq$ 99,5 %, BioScience-Grade	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid, reinst, Lebensmittelqualität	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat, p.a.	Merck, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Methanol, $\geq$ 99,9 %, p.a., ACS	Roth, Karlsruhe, Deutschland
MOPS Pufferan $\geq$ 99,5 %	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Mowiol 4-88	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumacetat, kristallin, p.a.	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumazid, reinst	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid $\geq$ 99,5 %, p.a.	Roth, Karlsruhe, Deutschland
NP-40, 10 %	Abcam, Cambridge, UK
Paraformaldehyd, reinst, DAC	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Phosphoric acid, ACS reagent, $\geq$ 85 wt. % in H <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
PNGase F (500 U/vial)	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Protease Inhibitor complete Mini (10 x)	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Proteinase K	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Purified BSA 100x	New England Biolabs, Ipswich, USA



Pyridin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Pyrophosphatase, Inorganic from baker's yeast	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Rotiphorese Gel 30 (37,5:1)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure, rauchend 37 %, p.a.	Roth, Karlsruhe, Deutschland
TEMED, 99 %, p.a., für die Elektrophorese	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trichlormethan/Chloroform, $\geq 99$ %, p.a.	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, $\geq 99,9$ %, p.a.	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypan Blue Solution	Fluka, Buchs, Schweiz
Tween 20, Ph.Eur.	Roth, Karlsruhe, Deutschland
UltraPure Agarose	Thermo Scientific, Waltham, USA
Xylol (Isomere)	Roth, Karlsruhe, Deutschland

#### 4.1.3. Enzyme und zugehörige Lösungen

<u>Enzym/Lösung</u>	<u>Hersteller</u>
DNase I, RNase-free (1 U/ $\mu$ l)	Thermo Scientific, Waltham, USA
dNTP Mix, 10 mM each	Thermo Scientific, Waltham, USA
MgCl <sub>2</sub> , 25 mM	Thermo Scientific, Waltham, USA
Pfu-Turbo DNA-Polymerase	Promega, Mannheim, Deutschland
RiboLock RNase Inhibitor	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
RNA-Ladepuffer, 2x	ThermoFisher, Waltham, USA
SensiFAST SYBR Hi-ROX mix (2x)	Bioline, London, UK
Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland

#### 4.1.4. Zellkulturmedien und Zusätze

<u>Name</u>	<u>Hersteller</u>
DMEM (1x)	Thermo Scientific, Waltham, USA
DMEM (1x) Glutamax	Thermo Scientific, Waltham, USA
DPBS	Thermo Scientific, Waltham, USA
Fetal Bovine Serum	Thermo Scientific, Waltham, USA
Fungizone Amphotericin B	Thermo Scientific, Waltham, USA
L-Glutamine 200mM (100x)	Thermo Scientific, Waltham, USA

Pen/Strep Penicillin/Streptomycin  
Trypsin-EDTA 0,25 % (1x)

Thermo Scientific, Waltham, USA  
Thermo Scientific, Waltham, USA

#### 4.1.5. Antikörper

##### Erstantikörper Name

Kaninchen anti-human ACOX3  
Antikörper, polyklonal HPA035840  
Kaninchen anti-human ATP6AP1  
Antikörper, polyklonal A1486  
Kaninchen anti-human  $\beta$ -Aktin  
Antikörper, monoklonal  
Kaninchen anti- human BiP Antikörper,  
monoklonal C50B12  
Kaninchen anti-human LC3A Antikörper  
polyklonal NBP1-78964  
Kaninchen anti-human Transferrin  
Antikörper, polyklonal DAK-Q032705-2  
Maus anti-human ERGIC-53 Antikörper,  
monoklonal 804-602-C100  
Ziege anti-human ApolipoproteinC-III  
Antikörper, polyklonal APOC32-A

##### Hersteller

Atlas Antibodies, Bromma, Schweden  
  
Sigma-Aldrich, St. Louis, USA  
  
Sigma Aldrich, St. Louis, USA  
  
Cell Signaling Technology, Leiden,  
Holland  
Novus Biologicals, Littleton, USA  
  
BIOZOL Diagnostica, Eching,  
Deutschland  
Enzo Life Sciences, Lörrach,  
Deutschland  
BIOTREND Chemikalien, Köln,  
Deutschland

##### Zweitantikörper Name

Kaninchen anti-Ziege IgG (H+L)-HRP  
conjugate 30220-200  
Ziege anti-Kaninchen IgG (H+L) Highly  
Cross-Adsorbed Secondary Antibody,  
Alexa Fluor 488 A-11034  
Ziege anti-Kaninchen IgG (H+L)-HRPO  
11-035-144  
Ziege anti-Mause IgG (H+L) Highly  
Cross-Adsorbed Secondary Antibody,  
Alexa Fluor 568 conjugate for IF, ICC  
and Flow A-11031

##### Hersteller

Alpha Diagnostic International, Texas,  
USA  
ThermoFisher, Waltham, USA  
  
Dianova, Hamburg, Deutschland  
  
ThermoFisher, Waltham, USA

Ziege anti-Maus IgG-HRP sc-2005

Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg,  
Deutschland**4.1.6. Kits und Standards**BezeichnungHersteller

Catalase Specific Activity Assay Kit

Abcam, Cambridge, UK

DC™ Protein Assay Kit

Bio-Rad, München, Deutschland

GeneRuler 100 bp DNA Ladder

ThermoFisher, Waltham, USA

GeneRuler 1 kb DNA Ladder, Ready-to-  
Use 250 to 10000 bp

ThermoFisher, Waltham, USA

Lipid (Oil Red O) staining Kit

Abnova, Walnut, USA

Omniscript RT Kit (50)

Qiagen, Hilden, Deutschland

PageRuler Prestained Protein Ladder

ThermoFisher, Waltham, USA

peqGOLD Gel Extraction Kit

PepqLab, Erlangen, Deutschland

Revert Aid First Strand cDNA Synthesis  
Kit

ThermoFisher, Waltham, USA

RNase-Free DNase Set

Qiagen, Hilden, Deutschland

Rneasy Mini Kit

Qiagen, Hilden, Deutschland

SuperSignal West Pico

ThermoFisher, Waltham, USA

Chemiluminescent Substrate

**4.1.7. Verbrauchsmaterialien**BezeichnungHerstellerAdhäsions Objektträger SuperFrost Plus  
Gerhard

Menzel, Braunschweig, Deutschland

Blotting-Papier 330 g/cm<sup>2</sup>

neoLab, Heidelberg, Deutschland

CIM Plate

ACEA Biosciences, San Diego, USA

Costar serologische Pipette (1, 5, 10, 25  
ml)

Corning Incorporated, Corning, USA

Deckgläser Stärke No. 1 24x55 mm

Waldemar Knittel Glasbearbeitungs  
GmbH, Braunschweig

Deckgläser Stärke No. 1 rund 12 mm

Paul Marienfeld, Lauda Königshofen,  
Deutschland

Dialyseclips Spectra/Por 35 mm	Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, USA
Dialyseschlauch, MWCO 12-14 kDa	neoLab, Heidelberg, Deutschland
Einwegskalpelle Nr. 21	Feather, Osaka, Japan
Hybond ECL nitrocellulose membrane	GE Healthcare Life Science, München, Deutschland
Kanülen Sterican (20, 22, 23 G)	Braun, Melsungen, Deutschland
Microplatte, 96-Well, flacher Boden, transparent	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Multiply-Pro 0,2 ml PCR-Gefäß	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Nalgene Kryoröhrchen für die Langzeitlagerung	ThermoFisher, Waltham, USA
Parafilm	American National, USA
Pasteur Capillary Pipettes 230/150 mm	Wilhelm Ulbrich, Bamberg, Deutschland
Pipettenspitzen (10, 200, 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäß (1,5 und 2,0 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Röhrchen mit Schraubverschluss 15 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Röhrchen mit Schraubverschluss 50 ml	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Sekuroka-Entsorgungsbeutel	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Sterilfilter Filtropur (S 0.2, S 0.45)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Whatman-Papier (3 mm)	Whatman-Vertrieb, Göttingen
Wägeschiffchen, Einweg 44 mm x 44 mm x 7 mm	neoLab Heidelberg, Deutschland
Wägepapier	neoLab Heidelberg, Deutschland
Zellkultur Flasche für adhärente Zellen (T-25, T-75, T-125)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturplatte 24-well	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

#### 4.1.8. Geräte

<u>Bezeichnung</u>	<u>Typ/Modell</u>	<u>Hersteller</u>
Autoklav	VX-95	Systec, Linden, Deutschland
Binokular	Stemi 2000-C	Zeiss, Jena, Deutschland

Blottkammer PerfectBlue Semi-Dry	Elektroblotter, SEDEC M	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Brutschrank	MCO-20A/C	Panasonic Biomedical Kadoma, Japan
Drehrad	Eigenbau	Universitätsklinikum, Heidelberg, Deutschland
Eismaschine	-	Ziegra, Isernhagen, Deutschland
Elektrophoresekammer	Eigenbau	Universitätsklinikum, Heidelberg, Deutschland
Elektrophoresekammer (große Gele)	Hoefer SE 600 Ruby standard vertical electrophoresis unit	Bioscience, Amersham, UK
Elektrophoresekammer (kleine Gele)	Mini-PROTEAN 3 Cell	Biorad, München, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop,	DMI4000B	Leica Wetzlar, Deutschland
Gefrierschrank, diverse 20°C	-	Liebherr Bulle, Schweiz
Gefrierschrank, diverse 80°C	-	Liebherr Bulle, Schweiz
Inkubator CO <sub>2</sub> Inkubator	MCO-20A/C	Sanyo, Loughborough, UK
Kühlschrank, diverse 4°C		Liebherr Bulle, Schweiz
Kühlzentrifuge	Biofuge fresco	Heraeus, Hanau, Deutschland
Magnetrührer	MR 3001	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Mastercycler	GeneAmp PCR System 2700	Applied Biosystems, Waltham, USA
Messerhomogenisator Art-Miccra	D-8	Labortechnik, Mülheim, Deutschland
Mikrowellenherd	R-233 (W)	Sharp, Osaka, Japan
Nanophotometer	P 300	Implen, München, Deutschland

Netzgerät	Electrophoresis Power Supply EPS 601	Amersham Bioscience, Amersham, UK
Netzgerät	Elektrophorese E835	Consort, Turnhout, Belgien
Phasenkontrastmikroskop	Wilovert	Hund, Wetzlar, Deutschland
pH-Meter	inoLab pH Level 1	WTW, Weilheim, Deutschland
Photometer	Spectra max Plus 384	Molecular Devices, Sunnyvale, USA
Pipetten	(0,5-10,0 µl, 2,0-20,0 µl, 20-200 µl, 100-1000µl)	Eppendorf Hamburg, Deutschland
Real-Time PCR System	StepOnePlus	Applied Biosystems, Waltham, USA
Reinstwasser	GenPure Pro UV-TOC/UF	ThermoFisher, Waltham, USA
Schüttelinkubator	HTMR-133 HLC Haep	Labor Consult, Bovenden, Deutschland
Schüttelinkubator	Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Sicherheitswerkbank	Klasse 2 SterilGard III Advance	The Baker Company, Sanford, USA
Spülmaschine	G7883CD	Miele, Gütersloh, Deutschland
Tischzentrifuge	Biofuge Pico	ThermoFisher, Waltham, USA
Ultraschall	Sonifier 450; Konverter 102C; Becherresonator 101-147-047	Branson, Dietzenbach, Deutschland
Ultraschallbad	Sonorex Super RK 255 H	Brandelin, Berlin, Deutschland
UV-Handlampe	VL-4.LC	Vilber, Eberhardzell, Deutschland

UV-Transilluminator	CN-TFX	Vilber, Eberhardzell, Deutschland
Vortexer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Wasserbad	1092	GFL, Burgwedel, Deutschland
Waage	PH204L Mettler	Toledo, Greifensee, Schweiz
Waage	XP56	Mettler Toledo, Greifensee, Schweiz
Westernblot Dokumentationssystem	Fusion SL4	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Wippe	Rocky 1100	Labortechnik Fröbe, Lindau, Deutschland
Zellproliferation	xCELLigence® RTCA DP	ACEA Biosciences, San Diego, USA
Zentrifuge	Centrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge	Centrifuge 5804 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge	Optima TLX120	Beckman Coulter, Brea, USA
Zentrifuge	Rotina 48 R	Hettich, Tuttlingen, Deutschland

#### 4.1.9. Puffer, Lösungen und Zellkulturmedien

Einfriermedium	Zellkulturmedium
	10% DMSO
Hungermedium	10% FCS
	0,5 mM Glucose
Lysispuffer	50 mM EDTA
	50 mM NaCl
	100 mM SDS 0,5% (w/v)
	Tris/HCl pH 8,0

Mowiol	6,0 g Glycerin 2,4 g Mowiol 4-88 6,0 ml H <sub>2</sub> O 0,2 M Tris/HCl pH 8,5
Ladepuffer DNA-Elektrophorese (6x)	40 % Saccharose (w/v) 0,25 % Bromphenolblau (w/v)
TAE-Puffer (50x)	2 M EDTA 100 mM Tris/Acetat pH 8,0
PBS-Puffer	8,0 g/l NaCl 11,5 g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,2 g/l KCl 0,2 g/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Tris/HCl pH 7,4
PBST-Puffer	PBS-Puffer 0,1 % Tween 20 (v/v) Tris/HCl pH 7,4
PFA-Lösung	4 % Paraformaldehyd (w/v) 8,0 g/l NaCl 11,5 g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,2 g/l KCl 0,2 g/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Tris/HCl pH 8,0
SDS-PAGE Anodenpuffer (große Gele)	50 mM Tris 380 mM Glycin
SDS-PAGE Elektrophoresepuffer (10x) (kleine Gele)	151,1 g Tris 50 g SDS 720 g Glycin
SDS-PAGE Kathodenpuffer (große Gele)	50 mM Tris 0,1 % SDS (w/v) 380 mM Glycin 0,2 mg/ml Bromphenolblau



SDS-PAGE Ladepuffer (6x)	12 % SDS (w/v) 45 % Glycerin (v/v) 12 % $\beta$ -Mercaptoethanol (v/v) 0,06 % Bromphenolblau (w/v) 480 mM Tris/HCl pH 6,8
SDS-PAGE Sammelgelpuffer	0,4 % SDS (w/v) 0,5 M Tris/HCl pH 8,8
SDS-PAGE Trenngelpuffer	0,4 % SDS (w/v) 1,5 M Tris/HCl pH 6,8
Semidry-Blot Anodenpuffer	20 % Methanol (v/v) 75 mM Tris/HCl pH 7,4
Semidry-Blot Kathodenpuffer	40 mM 2-Aminocapronsäure 20 % Methanol (v/v) 75 mM Tris/HCl pH 9,0
TBS (10x)	80 g/l NaCl 2 g/l KCl 30 g/l Tris/HCl pH 8,0
TBST-Puffer	TBS (1x) 0,1 % Tween 20 (v/v) Tris/HCl pH 7,4
Zellkulturmedium	DMEM Glutamax 10 % FCS 5 ml Penicillin/Streptomycin 5 ml Fungizone 5 ml L-Glutamin

## 4.2. Methoden

### 4.2.1. Methoden zur Arbeit mit genomischem Material

#### 4.2.1.1. Isolierung genomischer DNA

Zur Isolierung genomischer DNA aus humanen Fibroblasten wurden die mit PBS gewaschenen Zellpellets in 500  $\mu$ l Lysispuffer und 50  $\mu$ l Proteinase K Lösung (10 mg/ml Proteinase K in Lysispuffer) resuspendiert und anschließend bei 56°C im

Schüttelinkubator für 3 h verdaut. Zum Entfernen nichtverdauter Zellbestandteile wurden die Proben für 20 min bei 16000x g zentrifugiert und die im Überstand befindliche, genomische DNA in 2 ml Eppendorfgefäße überführt. 1400 µl unvergällter Ethanol wurden hinzupipettiert und das Tube vorsichtig invertiert bis die genomischen DNA fadenförmig ausgefallen war. Die DNA wurde anschließend mit Hilfe einer am Bunsenbrenner abgerundeten Glaspipette entnommen, durch einmaliges Eintauchen in 70%igen Ethanol gewaschen und kurz an der Luft getrocknet. Schließlich wurde die genomische DNA in 150 µl HPLC H<sub>2</sub>O aufgenommen und im Schüttelinkubator bei 37 °C gelöst. Bis zur weiteren Verwendung konnte sie bei 4 °C gelagert werden.

<u>Lysispuffer</u>	50 mM EDTA
	50 mM NaCl
	100 mM SDS 0,5% (w/v)
	Tris/HCl pH 8,0

#### **4.2.1.2. DNA-Präzipitation über die Ethanolfällung**

Zur Aufreinigung oder Aufnahme von DNA in einem anderen Probenpuffer wurde diese über die Ethanolfällung präzipitiert. Die Fällung der DNA in einer wässrigen Lösung erfolgte durch Zugabe von 0,1 Volumina 3 M Natriumacetat-Lösung (Endkonzentration 0,3 M) und 2-2,5 Volumina kaltem 99,8%igem Ethanol. Präzipitiert wurde die DNA für 10 min bei -80°C oder 20 min bei -20°C. Nach 10 min Zentrifugation bei voller Geschwindigkeit in einer Eppendorf-Tischzentrifuge wurde die ausgefallene, pelletierte DNA 2x mit 75%igem Ethanol durch 5-minütige Zentrifugation gewaschen. Das bei Raumtemperatur (RT) getrocknete DNA-Pellet wurde anschließend in destilliertem Wasser oder sterilem Puffer aufgenommen, sowie für weitere Experimente bei -20°C aufbewahrt.

#### **4.2.1.3. RNA-Isolation**

Die Isolierung von RNA aus humanen Fibroblasten erfolgte mit Hilfe des „RNeasy Mini Kits“ (Qiagen) nach Vorgabe des Handbuchs. Zum Zellaufschluss wurden die QIAshredder-Säulen verwendet. Vor Elution der RNA von den Säulen wurde die Proben zusätzlich, wie im Herstellerhandbuch beschrieben, mit DNase I verdaut. Zur Kontrolle der RNA-Qualität erfolgte die Auftrennung von 2 µl der isolierten RNA in 2x RNA-Ladepuffer auf einem 1%igen Agarosegel. Nicht degradierte RNA zeigte zwei

deutliche Banden der 18S und 28S Untereinheiten der ribosomalen RNA bei 4,7 kb und 1,8 kb.

#### **4.2.1.4. Spektrophotometrische Quantifizierung von DNA und RNA**

Die Konzentrationsbestimmung einer wässrigen DNA- oder RNA-Lösung erfolgte spektrophotometrisch durch Absorption von Licht bei 260 nm. Da Proteine Licht bei 280 nm absorbieren, kann durch Ermittlung des Quotienten der Messungen bei 260 nm und 280 nm (OD 260/ OD 280; optische Dichte) der Verunreinigungsgrad einer Lösung bestimmt werden. Ein Verhältnis von 1,8 bis 2,0 gilt als Richtwert für geringe Proteinverunreinigung [53].

#### **4.2.1.5. Reverse Transkription (RT) zur Herstellung von cDNA**

Bei der reversen Transkription Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR) wird zuvor isolierte RNA in cDNA umgeschrieben. Für diese Reaktion wurde das „Omniscript RT Kit“ (Qiagen) verwendet und nach Herstellervorgaben verfahren. Für eine Reaktion wurden 500 ng RNA isoliert aus humanen Fibroblasten eingesetzt. Die Inkubation des RT-PCR-Ansatzes erfolgte für 1 h bei 37°C und war folgendermaßen zusammengesetzt:

500 ng total-RNA
2 µl 10 x RT-Puffer
2 µl 5 mM dNTP
2 µl Hexamer Primer (10 pmol/µl)
1 µl RNase Inhibitor (40 U/µl)
1 µl Omniscript RT
<hr/> ad 20 µl H <sub>2</sub> O-RNase-frei

#### **4.2.1.6. DNA-Amplifikation über die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)**

Spezifische DNA-Fragmente wurden über die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) amplifiziert. In einigen Fällen wurde zur Erhöhung der Sequenzspezifität eine geschachtelte („nested“) PCR durchgeführt. Die Pfu-Turbo DNA-Polymerase wurde nach Herstellerangaben verwendet. Der PCR-Ansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

5 µl Probe des RT-Ansatzes  
 5 µl 10x Pfu-Puffer + MgSO<sub>4</sub>  
 1,25 µl F-Primer (10 pmol)  
 1,25 µl R-Primer (10 pmol)  
 1 µl dNTPs (10 mM)  
 1 µl Pfu-Polymerase  


---

 ad 50 µl ddH<sub>2</sub>O

Tab.4.1.: PCR Programm.

Schritt	Temperatur	Zeit	Funktion
1.	95°C	3 min	Denaturierung
2.	95°C	30 sek	Denaturierung
3.	55°C	30 sek	Annealing
4.	72°C	3 min	Elongation
5.	72°C	5 min	Elongation
6.	@ 4°C	∞	

Die Schritte 2-4 wurden 35 x wiederholt.

Die verwendeten *ATP6AP1*-spezifischen Primer waren der vorwärts Primer *ATP6AP1-F* (5'-CCCAGTACATGACCTTATGGG-3') und der rückwärts Primer *ATP6AP1-R* (5'-GGTTAGTTCAAATAAGGCACAG-3').

Eine „nested“ PCR wurde bei Amplifikation des Exon 4 des *ATP6AP1*-Gens aus genomischer DNA durchgeführt. Verfahren wurde laut Herstellerprotokoll der Pfu-Turbo DNA-Polymerase. Der PCR-Ansatz war folgendermaßen zusammengesetzt:

PCR #1: 100 ng Probe  
 5 µl 10x Pfu-Puffer + MgSO<sub>4</sub>  
 1,25 µl F1-Primer (10 pmol)  
 1,25 µl R1-Primer (10 pmol)  
 1 µl dNTPs (10 mM)  
 1 µl Pfu-Polymerase  


---

 ad 50 µl ddH<sub>2</sub>O

PCR #2:	1 µl Probe der PCR#1
	5 µl 10x Pfu-Puffer + MgSO <sub>4</sub>
	1,25 µl F2 -Primer (10 pmol)
	1,25 µl R2-Primer (10 pmol)
	1 µl dNTPs (10 mM)
	1 µl Pfu-Polymerase
	ad 50 µl ddH <sub>2</sub> O

Tab.4.2.: PCR Programm der „nested“ PCR.

Schritt	Temperatur	Zeit	Funktion
1.	95°C	3 min	Denaturierung
2.	95°C	30 sek	Denaturierung
3.	55°C	30 sek	Annealing
4.	72°C	#1 45 sek #2 30 sek	Elongation
5.	72°C	5 min	Elongation
6.	@ 4°C	∞	

Die Schritte 2-4 wurden 35 x wiederholt.

Die hierfür verwendeten, spezifischen Primerpaare waren *ATP6AP1-Ex4-F1* (5'-GAGCAGAGACGCTGGCTTTG-3') und *ATP6AP1-Ex4-R1* (5'-GCTCAGTGCTAGGCACCAAC-3') für die erste PCR sowie *ATP6AP1-Ex4-F2* (5'-GCCTTTATGGGTATGGCTTGC-3') und *ATP6AP1-Ex4-R2* (5'-GGAGTACTGGCATCTTTAGCC-3') für die zweite PCR.

#### 4.2.1.7. Agarosegelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Abhängig von der aufzutrennenden Größe des DNA-Fragments wurde die Prozentigkeit des Gels gewählt. Je kleiner das Fragment, desto höher die Prozentigkeit. Die DNA-Proben wurden mit 6x Ladepuffer in einem 1x Endvolumen versetzt und in die Geltaschen geladen. In der Regel wurden 1%ige Agarosegele gegossen, bei DNA-Fragmenten kleiner als 300 Basenpaaren (bp) 2%ige Gele. Hierzu löste man Agarose in 1x TAE-Puffer, unter Aufkochen. Das noch flüssige Gel wurde vor dem Gießen auf circa 60°C heruntergekühlt, bevor es mit 13 µl einer 1%igen Ethidiumbromidlösung versetzt wurde. Dieses interkaliert in Nukleinsäuren und kann

durch Bestrahlung mit UV-Licht im Transilluminator sichtbar gemacht werden. Die anschließende Elektrophorese erfolgte bei 120 Volt (10 V/cm) in 1x TAE Puffer.

<u>TAE-Puffer (50x)</u>	2 M EDTA 100 mM
	Tris/Acetat pH 8,0
<u>Ladepuffer DNA-Elektrophorese (6x)</u>	40 % Saccharose (w/v)
	0,25 % Bromphenolblau (w/v)

#### 4.2.1.8. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach dem Auftrennen spezifischer DNA-Fragmente ließen sich diese wieder aus dem Agarosegel isolieren und beispielsweise zum Einsenden für die Sanger-Sequenzierung verwenden. Hierzu wurden die Fragmente entsprechender Größe unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Die anschließende Extraktion erfolgte anhand des „peqGOLD Gel Extraction Kits“ (Peqlab), laut Herstellerbeschreibung. Zur weiteren Verwendung wurde die DNA jedoch mit 50 µl ddH<sub>2</sub>O und nicht dem im Kit enthaltenen Elutionspuffer eluiert.

#### 4.2.1.9. Quantitative Echtzeit-PCR (quantitative „realtime“ PCR, qRT-PCR)

Das Expressionslevel von Genen basierend auf der mRNA-Menge lässt sich über die qRT-PCR bestimmen. Die  $\Delta\Delta C_t$ -Methode ermöglicht eine relative Quantifizierung, bei der die Expression des Zielgens in einer Probe relativ zu einer Kontrolle bestimmt wird und zusätzlich auf ein Referenzgen, hier *RAB7A*, normiert wird. Dieser Fold-change berechnet sich wie folgt:

Fold-change =  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  mit

$$\Delta\Delta C_t = (C_{t\text{Zielgen}} - C_{t\text{Referenzgen}}) \text{ Probe} - (C_{t\text{Zielgen}} - C_{t\text{Referenzgen}}) \text{ Kontrolle}$$

Damit das Zielgen spezifisch amplifiziert werden konnte, wurden Primer entworfen, die ein PCR-Produkt mit einer Größe von 80 bis 300 bp ergaben. Ebenfalls wurde darauf geachtet, dass einer der Primer über zwei Exons verlief und/oder das Primerpaar durch ein Intron auf Ebene der genomischen DNA getrennt war. Hiermit sollten mit genomischer DNA verunreinigte Proben nicht mitamplifiziert oder schließlich anhand der Schmelzkurve identifiziert werden. Die Reaktion setzte sich wie folgt zusammen:

5,0 µl 2x SensiFAST  
 1,0 µl cDNA (50 ng)  
 0,4 µM F-Primer (10 pmol)  
 0,4 µM R-Primer (10 pmol)  


---

 ad 10,0 µl ddH<sub>2</sub>O

Die qRT-PCR wurde mit dem „Applied Biosystems StepOnePlus™ Real-Time PCR System“ unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Tab.4.3.: PCR Programm der qPCR.

Schritt	Temperatur	Zeit	Funktion
1.	95°C	2 min	Denaturierung
2.	95°C	0,05 min	Denaturierung
3.	55°C	0,10 min	Annealing
4.	72°C	0,15 min	Elongation
6.	@ 4°C	∞	

Die Schritte 2-4 wurden 40 x wiederholt.

Tab.4.4.: Die verwendeten Primer, einschließlich ihrer Sequenz.

Primernamen	Primersequenz
SLC35A1-F	AGCTACAAAAGTGGTGGTGA
SLC35A1-R	TCTGACAAGTAGACGCCAGC
SLC35A2-F	TCAAAGGTCTCACCTGCCTG
SLC35A2-R	GCTGGTATGTCACCTGGAAAG
SLC35A3-F	GTGGGCTCAGCCGGTC
SLC35A3-R	GTGCTCTTAGACTACATTTGCTGT
SLC35B2-F	GTGAATGCTGCTGGCTATGC
SLC35B2-R	TAAGACACCTGGAGCCCTGT
SLC35B3-F	GGAATCGCAGGGGCCAT
SLC35B3-R	TGGGTTTTGGATGGCACAGT
SLC35B4-F	GCGTGGTGAACAACCTATGCC
SLC35B4-R	GGGAAGTCACCTGCTTTGCT
SLC35C1-F	CTCTGCCTCAAGTACGTCGG
SLC35C1-R	AAGCCCCCGATGATGATACC
SLC35D2-F	CTGACCACCTACGGTTTCCC

<i>SLC35D2</i> -R	TCCAACGTAGAGGAGAGGCA
<i>RAB7A</i> -F	TGGGAGATTCTGGAGTCGGG
<i>RAB7A</i> -R	CACACCGAGAGACTGGAACC
<i>ATP6AP1</i> -F	GAGTGACCGGGACTTGTGG
<i>ATP6AP1</i> -R	CAGGAAGCACCAAGTGAGGAG
<i>B4GALT1</i> -F	TATGTTATCAACCAGGCGGGAG
<i>B4GALT1</i> -R	AGAGCAGAGACACCTCCAAAAT
<i>COG5</i> -F	TCCTTTCCAGAGGGCAGAGT
<i>COG5</i> -R	AGCCTTTTGAAGCAGCTGAAC
<i>MAN1B1</i> -F	AGGAGGAGGCCACAAAAAGG
<i>MAN1B1</i> -R	TTCAGATGCACTGGTGTGCC
<i>FUT4</i> -F	TGGCATGTAGGAAGCACCTG
<i>FUT4</i> -R	GCACGTGGAACTAGGAGGTC
<i>ST3GAL2</i> -F	CCTGGACCTTCTGTGGATCG
<i>ST3GAL2</i> -R	CCCGTACACGTTACCTCAT

#### 4.2.1.10. „Whole exome sequencing“ (WES)

Die Trio-basierte Sequenzierung des kompletten Exoms des Patienten sowie die Analyse der Sequenzdaten wurde vom Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) in Heidelberg mit dem vor Ort entsprechenden, vorliegenden bioinformatischen Hintergrund zur Exomdatenanalyse durchgeführt. Varianten mit einer geringen Allelfrequenz („minor allele frequency“, MAF) größer als 1 % innerhalb des „Exome Aggregation Consortium“ (ExAC) und der „1000 Genome Phase III“-Datenbank wurden als verbreitete Allele angesehen und folglich von der Kandidatenliste gestrichen. Lokale Kontrollproben wurden zur Entfernung technisch hervorgerufener Artefakte verwendet und dienten dem Ausschluss verbreiteter Allele, welche nicht in der oben genannten Datenbank zu finden waren. Nur nicht-synonyme Exonvarianten und Varianten mit  $\pm 2$  Basen um die Intron-Exon Kreuzung herum, welche als Spleißvarianten, „nonsense“-Varianten und Indel-Varianten klassifiziert werden konnten, wurden weiterhin in Betracht gezogen. Zur weiterführenden Analyse wurden die Varianten mit Hilfe von folgenden sieben, verschiedenen Prognose-Programmen beurteilt (SIFT [54], PolyPhen2 [55], LRT [56], MutationTaster [57], MutationAssessor [58], FATHMM [59] und PROVEAN [60] aus dbNSFP v2.0 [61] und CADD [62]).



#### **4.2.1.11. Sanger-Sequenzierung**

Die cDNA und die Sequenz von Exon 4 des *ATP6AP1*-Gens (RefSeq NM\_001183.5) aus Patienten- und Kontrollfibroblasten wurde über eine PCR amplifiziert und das PCR Produkte nach Auftrennung durch ein 1%iges Agaraosegel wie zuvor beschrieben extrahiert. Die Sequenzierung wurde über den Anbieter Seqlab durchgeführt und die Proben laut Beschreibung des Anbieters vorbereitet. Es wurden eigens designte *ATP6AP1* vorwärts und rückwärts Primer verwendet und jeweils separat der DNA für die Sequenzierung zugefügt. Weiterhin wurde zur Verifizierung der identifizierten Patientenmutation genomische DNA der Kontroll- und Patientenzellen zunächst mit dem QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) laut Herstellerprotokoll isoliert und Exon 4 über eine „nested“-PCR amplifiziert. Anschließend wurden die PCR-Produkte auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen, das *ATP6AP1*-Exon 4 PCR-Produkt ebenfalls extrahiert und mit den zweiten Primern der „nested“-PCR für die Sanger-Sequenzierung vorbereitet.

#### **4.2.2. Zellbiologische Methoden**

##### **4.2.2.1. Auftauen und Revitalisieren von Zellen**

In Flüssigstickstoff gelagerte Fibroblasten wurden für wenige Minuten in 70%igem Ethanol aufgetaut. Ab diesem Zeitpunkt wurde kontinuierlich unter der Sterilbank gearbeitet. 1 ml des auf 37°C aufgewärmten Zellkulturmediums wurde in das Röhrchen mit den Zellen überführt und bis zu ihrem vollständigen Auftauen vorsichtig auf- und abpipettiert. Um das zum Einfrieren verwendete DMSO-haltige Medium zu entfernen, erfolgte eine Zentrifugation der Zellen für 5 min bei 1200 rpm. Das erhaltene Pellet wurde in 5 ml frischem Zellkulturmedium aufgenommen und in eine T-25 Zellkulturflasche überführt. Durch vorsichtiges Schwenken der Flasche wurden die Fibroblasten gleichmäßig verteilt bevor sie sich absetzen konnten. Die Zellen wurden unter Standardbedingungen im Inkubator bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> gehalten. Am Tag darauf wurden die Zellen mit 5 ml DPBS gewaschen und dem gleichen Volumen an frischem Medium versetzt.

Zellkulturmedium

DMEM Glutamax  
10 % FCS  
5 ml Penicillin/Streptomycin  
5 ml Fungizone  
5 ml L-Glutamin

**4.2.2.2. Kultivierung eukaryotischer Zellen**

Zellkulturarbeiten erfolgten ebenfalls immer unter der Sterilbank. Konfluente Fibroblasten wurden auf eine neue Zellkulturflasche passagiert, um ihr optimales Wachstum weiterhin zu gewährleisten. Die Zellen wurden zum Ernten zunächst mit DPBS durch sanftes Schwenken gewaschen. Nach Abnehmen des DPBS wurden die Zellen mit 0,25%igem Trypsin 5 min bei 37°C inkubiert. Die Protease Trypsin spaltet Proteine nach den basischen Aminosäuren Lysin, Arginin und modifiziertem Cystein und führt dementsprechend zum Ablösen der Fibroblasten von der Oberfläche der Zellkulturflasche. Zum Abstoppen der Reaktion wurde das 5x Volumen des verwendeten Trypsins an Zellkulturmedium auf die Zellen gegeben. Vereinzeln ließen sich die zusammenhängenden Zellen durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren. Abhängig von Zelldichte und dem darauffolgenden Zellexperiment wurde ein Teil der Zellsuspension in eine neue Flasche überführt. Für bestimmte Nachfolgeexperimente war eine definierte Zellzahl notwendig und wurde mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer ausplattiert. Hierfür wurde durch Zentrifugation für 5 min bei 1200 rpm ein Zellpellet gewonnen, dessen Überstand abgenommen und mit dem gleichen Volumen DPBS gewaschen wurde. Das Zellpellet wurde erneut in Kulturmedium resuspendiert, die Zellen wie vom Hersteller angewiesen gezählt und anschließend ausplattiert.

**4.2.2.3. Kryokonservieren von Zellen**

Für zukünftige Verwendungen von humanen Fibroblasten können diese in flüssigem Stickstoff kryokonserviert und über Jahre gelagert werden. Hierzu wurden Zellen einer konfluenten T-75 Zellkulturflasche geerntet. Die trypsinisierten Zellen wurden für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert, einmal mit DPBS gewaschen und das Pellet wurde schließlich in 1,5 ml Zellkulturmedium resuspendiert. In drei Kryoröhrchen wurden jeweils 500 µl kaltes Einfriermedium vorgelegt, 500 µl der Zellsuspension hinzugegeben, durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gemischt und zügig auf Eis

überführt. Nach Überdauern der Zellen über Nacht bei -80°C wurden sie am nächsten Tag in flüssigem Stickstoff eingelagert.

Einfriermedium

Zellkulturmedium

10 % DMSO

#### **4.2.2.4. Supplementation humaner Fibroblasten**

24 h vor Beginn des Suppletionsversuchs wurden die Zellen auf das entsprechende Zellkulturgefäß ausgesät. Der Versuch startete mit 24-stündigem Hungern der Zellen. Vor Zugabe des Hungermediums wurde das Zellkulturmedium abgenommen und die Zellen 2x mit DPBS unter 5-minütiger Zentrifugation bei 1200 rpm gewaschen. Nach weiteren 24 h konnte das Hungermedium wieder abgenommen, die Zellen nochmals zweimal mit DPBS gewaschen und mit Medium, versetzt mit 250 µM Cu<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 24 h supplementiert werden. Nach der anschließenden Ernte konnten DNA, RNA und/oder Proteine für Folgeexperimente extrahiert werden.

Hungermedium

10 % FCS

0,5 mM Glucose

#### **4.2.2.5. Bestimmung der Zellproliferation**

Unter Verwendung des „XCelligence“ Geräts (ACEA Biosciences) und des beiliegenden Protokolls wurde die Zellproliferation der Kontroll- und Patientenfibroblasten im Zellkulturinkubator (37°C, 5 % CO<sub>2</sub>) bestimmt. 1000 Zellen wurden in die Wells der CIM Platten des gleichen Herstellers ausgesät und deren Proliferation unter Standardbedingungen über 120 h gemessen. Die Zelldichte wurde währenddessen computerbasierend alle 30 min analysiert. Dies erfolgte unter Messung des Widerstands anhand des Zellkontakts zu den Elektroden, welcher sich abhängig von Zelladhäsion, Zelldichte, Zell-Zell-Kontakt und auch Zellmorphologie änderte. Hiermit ließ sich schließlich die Proliferation bestimmen. Die Quantifizierung erfolgte anhand der Werte aus der Steigungsgeraden (1/h), die während der logarithmischen Phase der Zellen gemessen wurde.

#### **4.2.2.6. Immunfluoreszenzfärbung humaner Fibroblasten**

Proteine aus Fibroblasten lassen sich mittels immunomarkierter, spezifischer Antikörper nachweisen. Dies erfolgte in 24-well Zellkulturplatten, wobei in jedes der Wells ein autoklaviertes, gelatinisiertes Deckgläschen überführt wurde. Das

Gelatinisieren erfolgte tags zuvor in 0,1 % Gelatine in ddH<sub>2</sub>O unter Schwenken und anschließendem Trocknen unter der Sterilbank. Pro Well wurden, einen Tag bevor mit der Färbung begonnen wurde, 30000 Zellen ausgesät. Am Tag der Färbung wurden die Zellen in den Wells 3x mit DPBS gewaschen und mit 4 % PFA für 20 min bei RT fixiert. Um die Zellen zu permeabilisieren wurden diese in 0,5 % Triton X100, angesetzt in PBS, für 10 min bei RT inkubiert, woraufhin eine einstündige Inkubation in 5 % BSA in PBS zum Blocken unspezifischer Bindungen der Antikörper folgte. Daraufhin wurden die Zellen mit dem Erstantikörper-Mix inkubiert, wobei abhängig von den Herstellerinformationen unterschiedliche Verdünnungen des Erstantikörpers in 1 % BSA in PBS verwendet wurden. Im Falle eines Doppelansatzes mit zwei unterschiedlichen Antikörpern war darauf zu achten, dass diese aus zwei verschiedenen Wirtstieren stammen mussten. Nach 1 h bei 37°C folgten drei weitere Waschschrte mit PBS, je 5 min. Nun konnten die Zellen mit dem entsprechenden Zweitantikörper, angesetzt in 1 % BSA, 30 min bei 37°C inkubiert werden. Nachdem 3x 5 min mit PBS gewaschen wurde, folgten drei weitere 5-minütige Waschschrte mit Wasser. Schließlich wurde ein Tropfen Mowiol, zum Einbetten der Zellen, auf den Objektträger überführt und nach Trocknung über Nacht wurden die Proben unter dem Mikroskop betrachtet.

#### **4.2.2.7. Acridinorangegefärbung**

Verfahren wurde nach Thomé M. et al. 2016 [63]. Hierfür wurden Fibroblasten trypsiniert, gewaschen und  $1 \times 10^4$  Zellen im Farbstoff Acridinorange, verdünnt in Zellkulturmedium, aufgenommen. Im Anschluss erfolgte die Analyse über die Durchflusszytometrie.

#### **4.2.2.8. Lipid-Oil Red O Analyse**

Zur Analyse der Lipidtröpfchen in Zellen einer Kontrolle und des Patienten wurde das „Lipid (Oil-Red O) staining Kit“ (Abnova) verwendet. Ein Tag vor der Färbung wurden  $5 \times 10^4$  Zellen auf eine 24-well Platte ausgesät und am Tag der Färbung wurde laut Herstellerprotokoll verfahren. Schließlich konnten die Zellen mit dem Lichtmikroskop bei 20x Vergrößerung betrachtet und abschließend analysiert werden. Hierzu wurden die Zellen unter gleichen Belichtungsbedingungen aufgenommen und die Zellzahl einer Mikroskopieaufnahme bestimmt. Gezählt wurden alle Zellen, deren Zellkern komplett zu erkennen war und nicht vom Bildrand abgeschnitten wurde.

Quantifizieren ließ sich die Signalintensität der Rotfärbung mit der Software ImageJ, wobei der Hintergrund abgezogen wurde. Letztendlich wurde die gemessene Intensität mit der entsprechenden Zellzahl ins Verhältnis gesetzt und deren Mittelwerte bestimmt.

#### **4.2.3. Proteinbiochemische Methoden**

##### **4.2.3.1. Isoelektrische Fokussierung (IEF) des Serum-Transferrins**

Die IEF des Serum Transferrins wurde durchgeführt wie in Niehues et al. 1998 [21] beschrieben.

##### **4.2.3.2. Isoelektrische Fokussierung (IEF) des Apolipoprotein CIII**

Die IEF des Apolipoprotein-CIII wurde wie in Wopereis et al. 2003 [25] beschrieben durchgeführt.

##### **4.2.3.3. Proteinisolation aus Fibroblasten**

Es wurden Fibroblasten einer konfluenten T-75 Flasche geerntet, 2x mit DPBS gewaschen, in 500 µl Lysispuffer (0,1 %) resuspendiert und 3x für 10 sek mit Ultraschall behandelt (output control 8/10, duty cycle 80 %). Zum Kühlen der Probe wurden diese nach jedem 10 sek-Schritt für kurze Zeit auf Eis gekühlt. Nach dem Aufschluss der Fibroblasten folgte eine 20-minütige Inkubation des Homogenats auf Eis und die Überführung in 2 ml Reaktionsgefäße. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation für 20 min bei 13000 rpm und 4°C pelletiert und der Überstand in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt.

Wurden Zellextrakte für die Glykan-, Aminosäure-, Acylcarnitin- oder Lipid-Analyse vorbereitet, erfolgte der Aufschluss des Zellpellets in 500 µl ddH<sub>2</sub>O. Dazu wurden die in Wasser resuspendierten Fibroblasten für 2 bis 3 h bei -80°C weggefroren und nach anschließendem Auftauen mit einer 22G Nadel durch Auf- und Abziehen auf Eis, unter Nutzung der Scherkräfte, geöffnet. Nach Zentrifugation bei 13000 rpm konnte der Überstand abgenommen und für eine anschließenden Proteinbestimmung genutzt werden.

Lysispuffer

50 mM EDTA

50 mM NaCl

100 mM SDS 0,5 % (w/v)

Tris/HCl pH 8,0

**4.2.3.4. Proteinbestimmung nach Lowry**

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das „DC™ Protein Assay Kit“ (Bio-Rad) nach dem beigelegten Handbuch verwendet. Die BSA-Standardreihe mit 8 Standards zwischen 0,0 mg/ml und 2,0 mg/ml BSA Probenpuffer, sowie die zu messenden Proben wurden in eine 96-well Platte pipettiert. Es erfolgte eine Doppelbestimmung des Standards und der Proben. Nach Zugabe der Lösungen aus dem Kit und darauffolgender 20-minütiger Inkubation erfolgte die Messung der Absorption der Proben bei 750 nm im Photometer. Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte anhand der Regressionsgerade des BSA-Standards unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors.

**4.2.3.5. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Mittels SDS-PAGE wurden denaturierte Proteine anhand ihrer Größe eindimensional aufgetrennt. Das Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel wurde vor dem Lauf gegossen und die Lösungen wie in der Tab.4.5. angegeben angesetzt, wobei TEMED und APS zuletzt hinzugegeben wurden. Das Gel aus Trenn- und Sammelgel wurde zwischen zwei Glasplatten mit einem 1 mm Abstand gegossen.

Tab.4.5.: Zusammensetzung von kleinen und großen Acrylamidgelen für die SDS-PAGE mit einer Acrylamidkonzentration von 10 % im Trenngel.

	kleines Trenngel	kleines Sammelgel	großes Trenngel	großes Sammelgel
Rotiphoese	2010 µl	338 µl	10500 µl	1300 µl
Trenngelpuffer	1500 µl	--	7500 µl	--
Sammelgelpuffer	--	338 µl	-	2500 µl
10 % APS	60 µl	30 µl	250 µl	100 µl
TEMED	6 µl	3 µl	25 µl	10 µl
Wasser	2835 µl	1500 µl	11725 µl	6100 µl
Gelhöhe	5,6 cm	12,0 cm		

<u>SDS-PAGE Trenngelgelpuffer</u>	0,4 % SDS (w/v) 1,5 M Tris/HCl pH 6,8
<u>SDS-PAGE Sammelgelpuffer</u>	0,4 % SDS (w/v) 0,5 M Tris/HCl pH 8,8

Große Gele wurden pro Tasche mit 60 µg Protein, kleine Gele mit 30 µg Protein beladen. Davor wurde die Proteinlösung mit 6x SDS-Ladepuffer gemischt und 5 min bei 95°C denaturiert. Die Trennung der Proteine per Gelelektrophorese erfolgte in den kleinen Gelen bei einer konstanten Spannung von 100 V, bzw. bei einer konstanten Stromstärke von 60 mA in den großen Gelen. Waren die Proben in das Trenngel eingelaufen, konnte die Spannung bzw. Stromstärke auf 150 V (kleines Gel) bzw. 80 mA (großes Gel) erhöht werden. Für den Lauf der großen Gele wurde die Laufkammer oben mit Kathodenpuffer und unten mit Anodenpuffer befüllt, bei den kleinen Gelen wurde 1x SDS-PAGE Elektrophoresepuffer eingesetzt. Der Lauf wurde gestoppt sobald die Laufbande des Bromphenolblaus aus dem Ladepuffer das untere Ende des Gels erreicht hatte.

<u>SDS-PAGE Ladepuffer (6x)</u>	12 % SDS (w/v) 45 % Glycerin (v/v) 12 % β-Mercaptoethanol (v/v) 0,06 % Bromphenolblau (w/v) 480 mM Tris/HCl pH 6,8
<u>SDS-PAGE Elektrophoresepuffer (10x)</u> <u>(kleine Gele)</u>	151,1 g Tris 50 g SDS 720 g Glycin
<u>SDS-PAGE Kathodenpuffer (große Gele)</u>	50 mM Tris 0,1 % SDS (w/v) 380 mM Glycin 0,2 mg/ml Bromphenolblau
<u>SDS-PAGE Anodenpuffer (große Gele)</u>	50 mM Tris 380 mM Glycin

#### 4.2.3.6. Blotten von Proteinen

Die in einem SDS-Gel aufgetrennten Proteine wurden mit einem Elektrobplot nach dem „Semi-Dry“ Prinzip auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Hierfür wurde

das Gel nach dem Auftrennen 10 min in Kathodenpuffer gewaschen und mit Filterpapieren sowie Nitrozellulosemembran luftblasenfrei in die Blotkammer gelegt. Drei Filterpapiere bestimmt für die Seite der Anode der Kammer wurden in Anodenpuffer getränkt, die der Kathode in Kathodenpuffer. Da beim Blotten die negativ geladenen Proteine in Richtung Anode wandern, wurde der Blot wie folgt aufgebaut. Auf die Seite der Anode kamen die in Anodenpuffer getränkten Filterpapiere, darauf folgten die Nitrozellulosemembran, welche luftblasenfrei aufgelegt wurde, und zuletzt die in Kathodenpuffer getränkten Filterpapiere. Der Proteintransfer erfolgte für 50 min bei konstanter Stromstärke von  $1 \text{ mA/cm}^2$ . Nach dem Transfer wurden die Banden des Größenmarkers auf der Membran mit einem Kugelschreiber nachgezeichnet, damit diese auch später noch zu erkennen waren. Je nach Fragestellung und darauffolgendem Antikörper wurde die Membran in 5 % Milchpulver oder in 5 % BSA in PBST- oder TBST-Puffer 0,1 % geblockt und vor Antikörperinkubation im entsprechenden Puffer gewaschen.

<u>Semidry-Blot Anodenpuffer</u>	20 % Methanol (v/v) 75 mM Tris/HCl pH 7,4
<u>Semidry-Blot Kathodenpuffer</u>	40 mM 2-Aminocapronsäure 20 % Methanol (v/v) 75 mM Tris/HCl pH 9,0
<u>PBS-Puffer</u>	8,0 g/l NaCl 11,5 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 0,2 g/l KCl 0,2 g/l $\text{KH}_2\text{PO}_4$ Tris/HCl pH 7,4
<u>PBST-Puffer</u>	PBS-Puffer 0,1 % Tween 20 (v/v) Tris/HCl pH 7,4
<u>TBS (10x)</u>	80 g/l NaCl 2 g/l KCl 30 g/l Tris/HCl pH 8.0
<u>TBST-Puffer</u>	TBS (1x) 0,1 % Tween 20 (v/v) Tris/HCl pH 7,4



#### **4.2.3.7. Western Blot-Analyse**

Die bei einem Western Blot vom Gel auf die Membran übertragenen Proteine können spezifisch mit Antikörpern sichtbar gemacht werden. Je nach verwendetem Antikörper und Herstellerhinweis wurde die Membran aus dem Blot mit 5 % BSA oder 5 % Milchpulver in PBST 0,1 % oder TBST 0,1 % geblockt. Nach einstündigem Blocken wurde die Membran 3 x 15 min mit dem entsprechenden Puffer gewaschen. Der Primärantikörper wurde nach Herstellerangaben in PBST oder TBST verdünnt und die Membran in der Antikörperlösung eine Stunde inkubiert. Nach Abnahme des Antikörpers erfolgten drei weitere Waschschrte im entsprechenden Puffer. Im Anschluss an eine 45-minütige Inkubation mit dem in Puffer verdünnten HRP („horseradish peroxidase“, Meerrettichperoxidase)-gekoppelten Zweitantikörper wurde nochmals 3x gewaschen. Schließlich wurde die Membran mit dem „SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate“ (ThermoFisher) nach Herstellerangaben entwickelt. Es enthält ein Chemilumineszenzsubstrat, das von der Meerrettichperoxidase umgesetzt wird, sodass schließlich das vom Antikörper spezifisch gebundene Protein in der Expositionskammer des Fusion-Geräts sichtbar gemacht werden kann. Damit die Membran nicht austrocknete, wurde sie zwischen eine transparente Folie gelegt. Inkubiert wurde 5 min mit der ECL-Lösung, wobei die Chemilumineszenzreaktion gestartet wurde, nachdem die im Kit enthaltenen Lösungen zusammengeführt wurden. Die proteinspezifischen Banden ließen sich mit der Software ImageJ quantifizieren. Dafür wurde der  $\beta$ -Aktin-Antikörper als Ladekontrolle eingesetzt, nachdem die Membran „gestrippt“ wurde. Dies erfolgte durch eine 10-minütige Inkubation der Membran in 10 % Essigsäure, wobei Sekundär- und Primärantikörper entfernt wurden. Anschließend wurde die Membran so lange mit Puffer gewaschen bis die Essigsäure nicht mehr zu riechen war. Abschließend wurde, wie oben beschrieben, mit Erst- und Zweitantikörper inkubiert.

#### **4.2.3.8. N-Glykan Analyse**

N-Glykane aus dem humanen Serum wurden wie in Ruhaak et al. 2008 [64] beschrieben isoliert. 5  $\mu$ l der Probe wurde durch Zugabe von 2 % SDS denaturiert und für 10 min bei 0°C inkubiert. Die Abspaltung der Glykane vom Protein erfolgte durch Zugabe von 10  $\mu$ l einer speziellen Lösung bestehend aus 2 % NP-40 und 0,5 mU PNGase F in 2,5x PBS und wurde über Nacht bei 37°C inkubiert. Die verknüpfungsspezifische Derivatisierung der Sialinsäure und die Anreicherung der

Glykane wurde mittels hydrophiler Interaktionsflüssigkeitschromatographie (HILIC)-Festphasenextraktion („solid phase extraction“, SPE), wie in Reiding et al. 2014 [65] beschrieben, durchgeführt. 2 µl der angereicherten, ethylesterifizierten Glykane wurden zusammen mit 1 µl 5 mg/mL super-DHB in 50 % ACN und 1 mM NaOH auf ein MALDI (Matrix–Assistierte Laser–Desorption–Ionisierung)-Objekt (MTP AnchorChip 800/384 TF; Bruker Daltonics) getropft. Die Tropfen wurden bei RT luftgetrocknet. Alle massenspektrometrischen Analysen wurden im reflektorenpositiven Modus mit dem UltrafleXtreme Massenspektrometer und einem Smartbeam-II Laser (Bruker Daltonics) durchgeführt und durch flexControl 3.4 (Bauart 135; Bruker Daltonics) kontrolliert. Mit einem Fenster von  $m/z$  1000 bis 5000 wurden die Spektren in Kombination mit 10000 Laserschüssen, bei einer Frequenz von 1000 Hz aufgenommen, unter Verwendung eines zufälligen Laufmusters von 100 Schüssen pro Rasterpunkt. Tandemmassenspektrometrie (MALDI-TOF/TOF-MS/MS) wurde auf die häufigsten Peaks des N-Glykoms mittels laserinduzierter Dissoziation angewandt. Zur relativen Quantifizierung und Qualitätskontrolle der Massenspektren und Analyten wurden die rohen Spektrendaten aus flexAnalysis 3.4 (Bauert 76; Bruker Daltonics) als Textdatei (x, y) exportiert und weiter mit MassyTools (Version 0.1.8.0) bearbeitet. Dieses Bearbeitungsprogramm führte zuerst eine interne Kalibrierung durch, basierend auf einer zuvor definierten Liste von Analyten. Letztendlich wurden hiermit die Fraktion des Analytenbereichs über S/N 9 innerhalb eines Spektrums, das höchste Isotop S/N und der ppm-Fehler pro Analyt für jedes Spektrum erhalten. Weiterhin erhielt man einen Wert, welcher die Trefferquote zwischen dem beobachteten und dem theoretischen Isotopen-Umschlag pro Glykan, für jedes Spektrum (OC), angab. Die Analyte gingen durch eine Kuration basierend auf einer biologischen Gruppe (eine Kombination aus Typ und Erkrankung) mit einem S/N > 3, einem ppm-Fehler unter 20 und einem QC-Wert unter 0,05. Die strukturellen Informationen in Bezug auf die Sialinsäureverknüpfung und -typ (anhand der Masse), die Zusammensetzung der Zuckerantennen und die Lokalisation der Fukose wurden aus MALDI-TOF/TOF-MS/MS Daten ermittelt.

#### **4.2.3.9. Analyse der Aminosäuren und Acylcarnitine**

Sowohl die Aminosäuren als auch Acylcarnitine aus Zelllysaten der Kontroll- (100 µg) und Patientenfibroblasten sowie Kontroll- und Patientenserum wurden über die Elektronenspray-Ionisationsmassenspektrometrie (ESI-MS/MS) analysiert. Hierzu

wurde ein Quattro Ultima Dreifach Quadrupol Massenspektrometer (Micromass, Manchester, UK) verwendet, welches mit einer Elektronenspray-Ionenquelle und einem Micromass MassLynx Datensystem ausgestattet war [66]. Aus den Messdaten wurden Mittelwerte erstellt, die Werte von Kontrolle und Patient ins Verhältnis gesetzt sowie die Messergebnisse der Kontrolle auf 1 beziehungsweise 100 % gesetzt. Die Quotienten aus Kontrolle und Patient wurden dagegen verglichen, Standardabweichungen und Signifikanzen ermittelt.

#### **4.2.3.10. Analyse zellulärer Lipide**

Die quantitative Lipidanalyse erfolgte durch die Methode der Nanoelektronenspray-Ionisationstandemmassenspektrometrie aus Zelllysaten von Kontroll- und Patientenfibroblasten (100 ng) [67]. Nebeneinander dargestellt wurden die Mittelwerte der Lipidmessungen, errechnet aus Kontroll- und Patientenergebnissen.

#### **4.2.3.11. Bestimmung der Katalaseaktivität**

Für die Messungen der Katalaseaktivität in Fibroblasten des Patienten und einer Kontrolle wurde das „Catalase Activity Assay Kit“ (Abcam) verwendet. Sowohl für den Verlauf des Assays als auch die Berechnung und damit letztendlich die Bestimmung der Aktivität wurde entsprechend des Herstellerprotokolls verfahren. Aufgeschlossen wurden  $0,5 \times 10^6$  Zellen befindlich in der logarithmischen Wachstumsphase.

#### **4.2.3.12. Statistik**

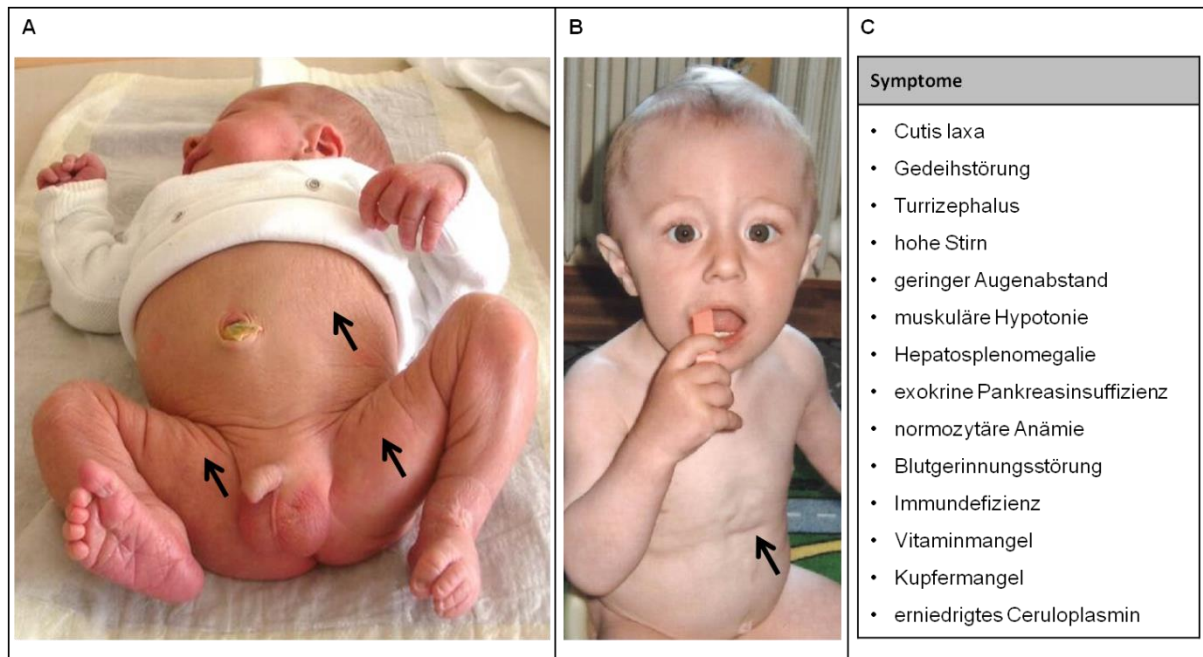
Alle Versuche wurden mindestens dreimal wiederholt, die Mittelwerte und Standardabweichung bestimmt. Die Daten wurden mit dem Student'schen t-Test analysiert. Ein p-Wert von  $\leq 0,05$  (\*  $0,05 \geq p \geq 0,01$ ; \*\*  $0,01 \geq p \geq 0,001$ ; \*\*\*  $0,001 \geq p$ ) wurde als signifikant angesehen. Die Daten werden im Folgenden als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dargestellt.

## 5. Ergebnisse

### 5.1. Anamnese eines männlichen Patienten mit multiorganischem Krankheitsbild

Der männliche Patient wurde 2008 als erstes Kind gesunder, nicht konsanguiner, kaukasischer Eltern geboren. In Bezug auf metabolische und neurologische Defizienzen ist die Familiengeschichte unauffällig. Während der Schwangerschaft zeigten sich eine pathologische Nackenfalte, sowie eine intrauterine Trikuspidalinsuffizienz aufgrund einer undichten Trikuspidalklappe des Herzens. Weiterhin wurde eine Arachnoidalzyste in der mittleren Hirnhaut detektiert. Geboren wurde der Patient in der 39. Schwangerschaftswoche mit einem Gewicht von 3270 g (40. Perzentile), einer Größe von 50 cm (25. Perzentile) und einem Kopfumfang von 35,5 cm (70. Perzentile). Bereits in der zweiten Lebenswoche zeigte der Junge vor allem im Bereich des Abdomens, der Arme und Beine deutliche Cutis laxa Symptome (Abb.5.1.A). Im dritten Lebensmonat wurde beim Patienten eine Splenomegalie diagnostiziert (Abb.5.1.B). Nachfolgeuntersuchungen im Alter von sechs Monaten ergaben zudem eine schwache Ausprägung eines Turmschädels (Turризephalus) mit hoher Stirn und kleinem Augenabstand, Pseudostrabismus sowie Mikrozephalie. Es zeigte sich weiterhin eine deutliche exokrine Pankreasinsuffizienz (Trypsin  $< 2,5 \mu\text{g/l}$ , Referenzwert  $10\text{-}57 \mu\text{g/l}$ ; Pankreaselastase (Stuhl)  $< 15 \mu\text{g/g}$ , Referenzwert  $> 200 \mu\text{g/g}$ ). Auffällig waren ferner eine Hyperextension von Fingern, Ellbogen und Knien, muskuläre Hypotonie und Hepatomegalie in Verbindung mit Hepatopathie. Weitere Hinweise auf eine bestehende Lebererkrankung waren auch in den erhöhten Werten für diverse Leberenzyme wie der Aspartat-Aminotransferase (AST) ( $110 \text{ U/l}$ , Referenzwert  $< 40 \text{ U/l}$ ) und der Alanin-Aminotransferase (ALT) ( $69 \text{ U/l}$ , Referenzwert  $< 45 \text{ U/l}$ ) zu finden (Tab.5.1.). Der Gallenweg wie auch die Gallenblase waren unauffällig, ebenso wie die Milz ( $92 \times 75 \times 37 \text{ mm}$ ). Desweiteren zeigten sich Symptome wie eine glomeruläre und tubuläre Proteinurie, Gedeihstörung, Entwicklungsretardierung, eine normozytäre Anämie mit veränderten Hämatokrit- und Hämoglobinwerten (Hämoglobin  $8,7 \text{ g/dl}$ , Referenzwerte  $9,6\text{-}12,4 \text{ g/dl}$ ; Hämatokrit  $24,1 \%$ , Referenzwert  $28,6\text{-}37,2 \%$ ), Thrombopenie (Thrombozyten  $83 \times 10^3 /\mu\text{l}$ ; Referenzwert:  $244\text{-}529 \times 10^3 /\mu\text{l}$ ), Panzytopenie und Gerinnungsstörung (partielle Thromboplastinzeit (PTT)  $60,3 \text{ sek}$ , Referenzwert  $20\text{-}50 \text{ sek}$ ; Antithrombin-III (ATIII)

38 %, Referenzwert 70 - 120 %; Fibrinogen 1,3 g/dl, Referenzwert 1,8 – 3,5 g/dl). Häufige Infektionen und wiederholter Antikörpermangel nach Impfungen (z.B. Masern, Mumps, Röteln und Windpocken), was auf eine Immundefizienz deuten ließ, waren weitere charakteristische Symptome (Immunglobulin G (IgG) 474 mg/dl, Referenzwert 572 - 1474 mg/dl; Immunglobulin A (IgA) 14 mg/dl, Referenzwert 34 - 305 mg/dl). Der Patient litt bei Erstanamnese unter starkem Durchfall, der vermutlich durch einen Mangel an Verdauungsenzymen aufgrund der gestörten Funktion der Bauchspeicheldrüse verursacht wurde. Eine eingeleitete Therapie mit Kreon (25000 U/Tag), einem Medikament mit dem Wirkstoff Pankreatin, welches die fehlenden Verdauungsenzyme des Pankreas ersetzt, führte jedoch rasch zu einer vollständigen Normalisierung der Darmtätigkeit. Aufgrund eines nachgewiesenen Mangels im Blut bekam der Patient zusätzlich die fettlöslichen Vitamine D1, K4, E1 und A1. Der weitere Entwicklungsverlauf des Patienten über die Jahre verlief meist altersentsprechend. Er begann mit einem Jahr zu sprechen und konnte mit eineinhalb Jahren alleine gehen. Auch verbesserte sich die Cutis laxa Symptomatik und verblieb nur in milder Form im Bereich des Abdomens (Abb.5.1.B). Die Blutgerinnung normalisierte sich weitestgehend. Er ging in einen normalen Kindergarten bis er 6 Jahre alt war und besuchte anschließend eine reguläre Grundschule. Im Alter von fünf Jahren lernte er Fahrradfahren und Schwimmen. Mit acht Jahren war er 135,7 cm groß (zwischen dem 50. - 75. Perzentil) und 27,8 kg schwer. Seine Haut sah blass aus und zeigte durchsichtige Venen. Eine leichte Form der Cutis laxa um das Abdomen persistierte. Der rechte Leberlappen war weiterhin vergrößert (77 mm x 110 mm) und zeigte auch zwei glatte, abgegrenzte echoreiche Veränderungen in Segment II und V mit einer Größe von 7 mm x 5 mm. Anzeichen einer Zirrhose waren jedoch nicht zu erkennen. Die Milz war ebenfalls leicht vergrößert (120 mm x 40 mm), zeigte aber ein für homogenes Gewebe charakteristisches, normales Echomuster. Die vergrößerte Nebenniere (1,5 cm x 1,8 cm), die schon im Alter von sechs Jahren detektiert wurde, war im Alter von acht Jahren noch immer um 1,6 cm vergrößert. Es gab keine Anzeichen einer Aszites, einer Bauchwassersucht. In den medizinischen Kontrollen des Patienten wurde zusätzlich ein Kupfermangel (5 µmol/l, Referenzwert 12,6 - 19 µmol/l) sowie ein Mangel des Ceruloplasmins (0,15 g/l, Referenzwert 0,2 – 0,6 g/l) im Blut festgestellt (Abb.5.1.; Tab.5.1.).



**Abb.5.1.: Klinische Symptome des neu identifizierten, männlichen Patienten.** A) Patient in der ersten bis zweiten Lebenswoche mit dem Cutis laxa Syndrom, vor allem am Abdomen, den Beinen (siehe Pfeile) und Armen (nicht zu erkennen). B) Patient im Alter von vierzehn Monaten. Eine generelle Besserung der Cutis laxa ist zu erkennen. C) Zusammenfassung des multiorganischen Phänotyps des Patienten.

**Tab.5.1.: Dokumentierte biochemische Laborwerte des Patienten.**

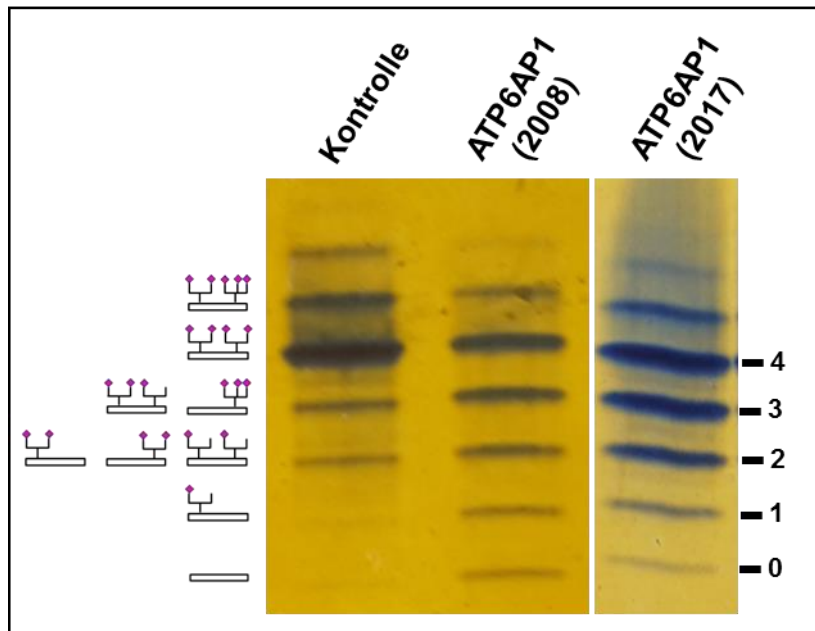
Labor	Werte	Referenzwerte
<b>Trypsin</b>	< 2,5 µg/l	10 – 57 µg/l
<b>Pankreaselastase</b>	< 15 µg/g	> 200 µg/g
<b>AST (Aspartat-Aminotransferase)</b>	100 U/l	< 40 U/l
<b>ALT (Alanin-Aminotransferase)</b>	69 U/l	< 45 U/l
<b>Hämoglobin</b>	8,7 g/dl	9,6 -12,4 g/dl
<b>Hämatokrit</b>	24,1 %	28,6 - 37,2 %
<b>Thrombozyten</b>	83 x 10 <sup>3</sup> /µl	244 - 529 x 10 <sup>3</sup> /µl
<b>PTT (partielle Thromboplastinzeit)</b>	60,3 Sek	20 - 50 Sek
<b>ATIII (Antithrombin-III)</b>	38 %	70 - 120 %
<b>Fibrinogen</b>	1,3 g/dl	1,8 – 3,5 g/dl
<b>IgG (Immunglobulin G)</b>	474 mg/dl	572 - 1474 mg/dl
<b>IgA (Immunglobulin A)</b>	14 mg/dl	34 - 305 mg/dl
<b>Kupfer</b>	5 µmol/l	12,6 - 19 µmol/l
<b>Ceruloplasmin</b>	0,15 g/l	0,2 – 0,6 g/l

## 5.2. Identifizierung eines N-Glykosylierungsdefekts vom CDG-Typ II

### 5.2.1. Diagnose durch die isoelektrische Fokussierung des Serum-Transferrins

Aufgrund seines multiorganischen Phänotyps wurde der Patient auf die Stoffwechselerkrankungsgruppe „Congenital Disorders of Glycosylation“ (CDG) getestet. Der initiale Test auf einen N-Glykosylierungsdefekt erfolgte anhand der isoelektrischen Fokussierung (IEF) des Serum-Transferrins (Abb.5.2.).

Das Ergebnis der IEF mit dem Serum aus 2008 (Geburtsjahr) zeigte im Vergleich zu einer gesunden Kontrolle reduzierte Werte der vollständig glykosylierten Tetrasialotransferrinbande (28,4 %, Referenzwert 30 % - 55 %) sowie erhöhte Werte für Tri- (21,3 %, Referenzwert 4 % - 17,5 %), Di- (14,7 %, Referenzwert 5 % - 13,5 %), Mono- (7,9 %, Referenzwert 0 % - 3 %) und Asialotransferrin (6,1 %, Referenzwert 0 % - 2 %). Dieses Fokussierungsmuster ist charakteristisch für einen CDG-II Defekt. In der Verlaufskontrolle mit einer Serumprobe aus dem Jahr 2017 zeigte sich weiterhin das CDG-II Muster, jedoch mit einer deutlichen Verbesserung der Tetra- (38,4 %, Referenzwert 30 % - 55 %) und Asialotransferrinbande (1,6 %, Referenzwert: 0 % - 2 %) in Richtung der jeweiligen Referenzbereiche. Bei Betrachtung der Tri- (31,3 %, Referenzwert 4 % - 17,5 %) und Disialotransferrinbande (21,3 %, Referenzwert 5 % - 13,5 %) wurde im Vergleich zur Serumprobe von 2008 ein schwacher Anstieg des quantifizierten Signals festgestellt, wohingegen sich die Menge an Monosialotransferrin (7,3 %, Referenzwert: 0 % - 3 %) geringfügig reduziert hatte.

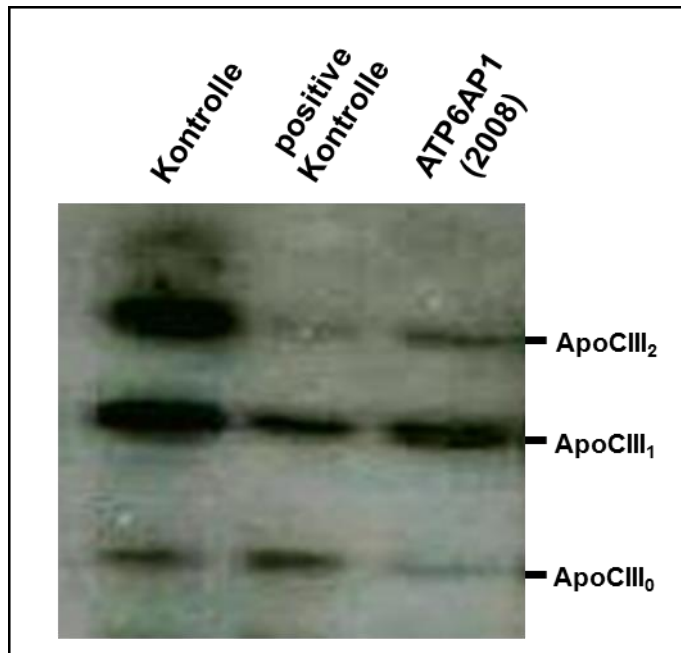


**Abb.5.2. Isoelektrische Fokussierung (IEF) des Serum-Transferrins aus Serumproben des Patienten von 2008 und 2017.** Der Patient zeigt ein Transferrin-Bandenmuster vom CDG Typ II mit reduziertem Wert der vollständig glykosylierten Tetrasialotransferrinbande sowie erhöhten Werten der Tri-, Di-, Mono- und Asialotransferrinbande, im Vergleich zu einer Kontrollserumprobe. Die IEF des Serums von 2017 zeigte bei Quantifizierung einen geringfügigen Anstieg der Tetrasialotransferrinbande und eine Reduktion des Monosialotransferrins.

### 5.2.2. Unauffällige isoelektrische Fokussierung des Apolipoprotein CIII

Bei den Mucintyp O-Glykanen gibt es drei verschiedene Isoformen (ApoCIII<sub>0-2</sub>), die entweder zwei Sialinsäurereste (ApoCIII<sub>2</sub>), einen Sialinsäurerest (ApoCIII<sub>1</sub>) oder keine Sialinsäurereste tragen (ApoCIII<sub>0</sub>) (Abb.5.3.). Die Kontrolle zeigte das vollständig glykosylierte ApoCIII<sub>2</sub> (45,3 %, Referenzwert 27,4 % - 60 %) als dominante Form sowie auch ähnlich hohe Werte des ApoCIII<sub>1</sub> (38,7 %, Referenzwert 33,1 % - 66,9 %), wobei ApoCIII<sub>0</sub> (15,9 %, Referenzwert 0 % - 11,6 %) nur schwach vorhanden war. Bei Betrachtung des Patienten wurde ApoCIII<sub>1</sub> als Hauptisoform (57,7 %, Referenzwert 33,1 % - 66,9 %) des Proteins nachgewiesen. Allerdings befanden sich ApoCIII<sub>2</sub> (35,7 %, Referenzwert 27,4 % - 60 %) und ApoCIII<sub>0</sub> (6,5 %, Referenzwert 0 % - 11,6 %) beide im Referenzbereich, weshalb von keinem O-Glykosylierungsdefekt ausgegangen wurde.





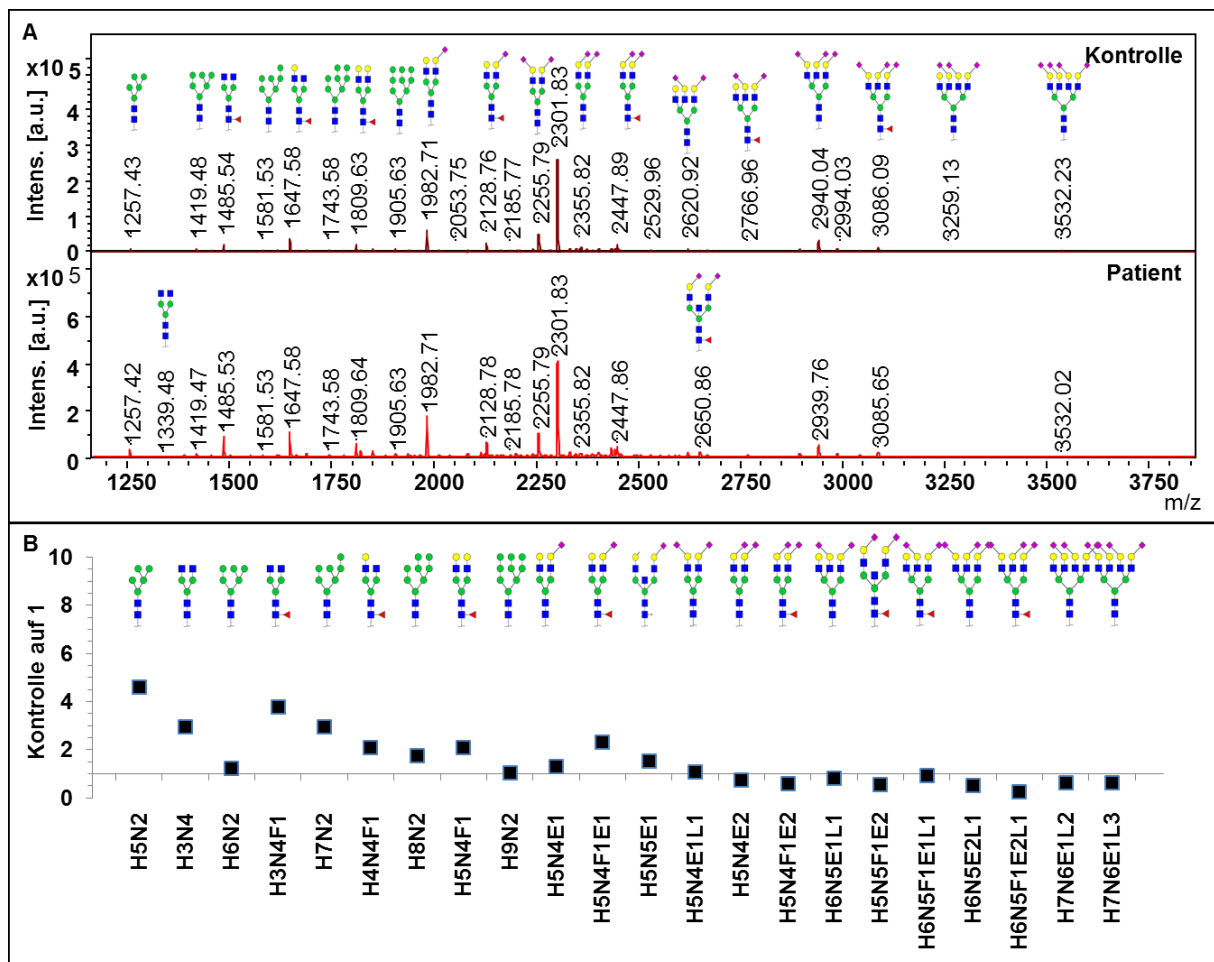
**Abb.5.3.: Isoelektrische Fokussierung (IEF) des Apolipoproteins-CIII (ApoCIII) aus einer Serumproben des Patienten von 2008.** Bei der Analyse des ApoCIII des Patienten im Vergleich zu einer gesunden und einer positiv betroffenen Kontrolle lagen die Werte der Isoformen ApoCIII<sub>2</sub> und ApoCIII<sub>0</sub> innerhalb des Referenzbereichs und somit zeigte sich keine Veränderung der Mucintyp O-Glykane.

### 5.2.3. N-Glykananalyse aus dem Serum zeigte abweichende Glykanwerte

Zur weiterführenden Untersuchung der Hypoglykosylierung des Patienten wurden die N-Glykane aus dem Patientenserum (2008) in Zusammenarbeit mit der AG Wuhler (Universität Leiden, Niederlande) mit Hilfe der positiven Reflektron MALDI-TOF Massenspektrometrie gemessen (Abb.5.4.A). Die Massen wurden über MALDI LIFT-TOF/TOF MS selektiert. Dargestellt sind die Ergebnisse der 22 (total 67 detektierte N-Glykanpeaks) häufigsten, detektierten N-Glykane aus dem Patientenserum gegen männliche Kontrollseren (n = 6, altersgleich, auf 1 gesetzt) (Abb.5.4.B; Tab.8.1.). Im Gegensatz zu den Kontrollen zeigte der Patient eine generelle Erhöhung verkürzter, diantennärer Strukturen. Neben dem auffälligsten Peak des Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub> Glykans (H5N2, m/z 1257,42), welcher um einen 4,6x Wert erhöht war, zeigte auch das am Kern fukosylierte GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub> Glykan (H3N4F1, m/z 1485,54) einen Anstieg um den 3,78x Wert. Ebenfalls waren das nicht fukosylierte GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>3</sub>-GlcNAc<sub>2</sub> (H3N4, m/z 1339,48, 2,96x) sowie das Man<sub>7</sub>GlcNAc<sub>2</sub> Glykan (H7N2, m/z 1743,58, 2,94x) deutlich erhöht. Weiterhin wurde eine Reduktion komplexer, sialylierter Strukturen vom Glykan H5N4E2 (m/z 2355,82, 0,72x) bis hin zu H7N6E1L3 (m/z 3532,23, 0,61x) detektiert.

Hinzu kam eine Verschiebung des Komplex-Typs der N-Glykane in Richtung der mannosereichen Struktur und des Hybrid-Typs im Vergleich zu den Kontrollen. In

den Kontrollen ergab sich ein Verhältnis von Komplex-Typ zu mannosereichem Typ zu Hybrid-Typ von  $96,62 \% \pm 0,56 \%$  zu  $2,06 \% \pm 0,36 \%$  zu  $0,69 \% \pm 0,19 \%$ . Im Gegensatz dazu zeigte der Patient ein Verhältnis von  $94,2 \%$  zu  $4 \%$  zu  $1,2 \%$ . Obwohl für den Komplex-Typ eine nicht signifikante Veränderung nachgewiesen wurde ( $-2,42 \%$ ), ergab sich aber ein signifikantes Plus von  $93,67 \%$  für den mannosereichen Typ und  $80,34 \%$  für den Hybrid-Typ.

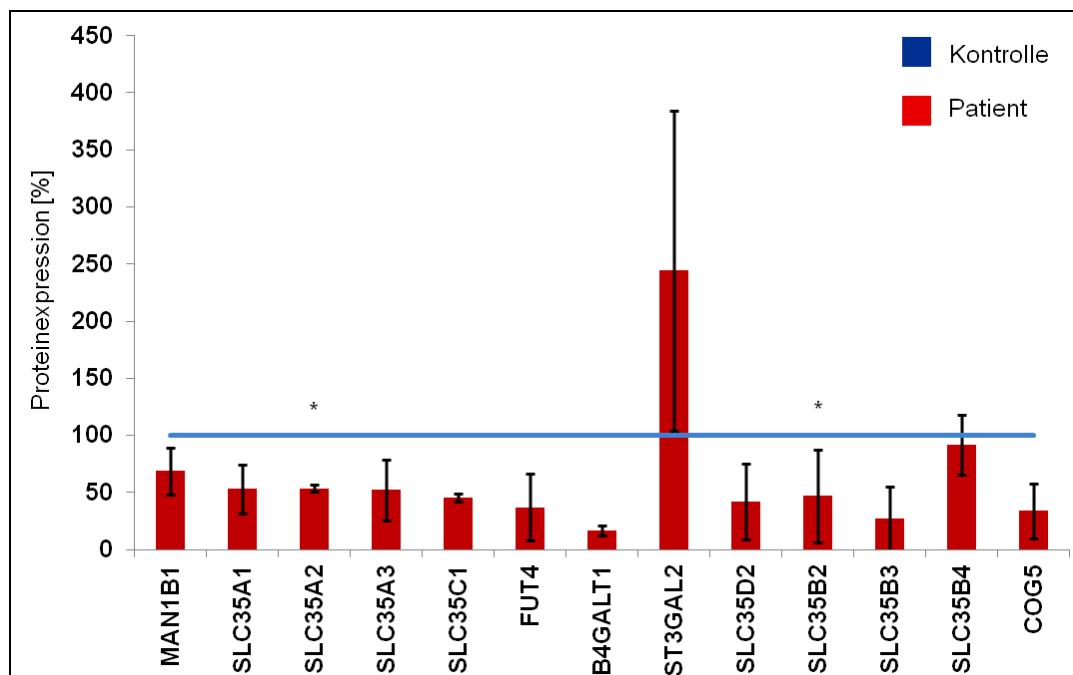


**Abb.5.4.: N-Glykananalyse des Patientenserums im Vergleich zu männlichen Kontrollseren.** Die Glykankompositionen setzen sich zusammen aus Hexosen (H), N-Acetylhexosaminen (N), Deoxyhexosen (Fukose; F), laktosylierte 2,3-verknüpfte Sialinsäuren (L) und ethylesterifizierte 2,6-verknüpfte Sialinsäuren (E). A) Positive Reflektoren-MALDI-TOF Massenspektrometrie mit den häufigsten Peaks des N-Glykoms von Kontrolle und Patient. B) Quantifizierung ausgewählter N-Glykane relativ zu den Kontrollen (gesetzt auf den Referenzwert 1) zeigte eine Anhäufung verkürzter, diantennärer Strukturen bei gleichzeitig vermindert vorliegenden komplexen, sialylierten Strukturen.

#### 5.2.4. Abweichende mRNA-Expression einiger golgispezifischer Proteine

Da das CDG-II Muster der IEF des Serum-Transferrins sowie die massenspektrometrische Analyse der N-Glykane auf eine Beteiligung des Golgi-Apparats am Glykosylierungsdefekt unseres Patienten schließen ließen, wurden diesbezüglich verschiedene Glykosyltransferasen und Zuckernukleotidtransporter des *cis*- bis *trans*-Golgi-Kompartiments auf mRNA-Ebene mit Hilfe der qRT-PCR

analysiert (Abb.5.5.). Abgesehen von der *CMP-N-Acetylneuraminat- $\beta$ -Galaktosamid- $\alpha$ -2,3-Sialyltransferase 2* (*ST3GAL2*) mit einem Anstieg bis auf 244,33 % bei jedoch hoher Standardabweichung von  $\pm 140,13$  % waren alle anderen getesteten Faktoren reduziert. Die niedrigste mRNA-Expression wurde bei der  *$\beta$ -1,4-Galaktosyltransferase 1* (*B4GALT1*) runter bis auf 16,66 %  $\pm 4,17$  % detektiert, daraufhin folgten der *Adenosin3'-phospho5'-Phosphosulfat-Transporter 2* (*SLC35B3*) 26,75 %  $\pm 28,12$ %, der „*Conserved Oligomeric Golgi complex subunit 5*“ (*COG5*) 33,67 %  $\pm 23,87$  %, die  *$\alpha$ -1,3-Fukosyltransferase 4* (*FUT4*) 37 %  $\pm 29,46$  % sowie der *UDP-N-Acetylglucosamine/UDP-Glukose/GDP-Mannose-Transporter* (*SLC35D2*) 41,87 %  $\pm 33,26$  %, der *GDP-Fukose-Transporter 1* (*SLC35C1*) 45,61 %  $\pm 3,36$  %, der *Adenosine3'-phospho5'-Phosphosulfat-Transporter 1* (*SLC35B2*) 47 %  $\pm 40,6$  % und ebenfalls der *UDP-N-Acetylglucosamin-Transporter* (*SLC35A3*) 52 %  $\pm 26,32$  %. Weiterhin waren der *CMP-Sialinsäure-Transporter* (*SLC35A1*) 53,06 %  $\pm 21,33$  %, der *UDP-Galaktose-Translokator* (*SLC35A2*) 53,53 %  $\pm 2,93$  %, die *Endoplasmatische Retikulum Mannosyl-Oligosaccharid 1,2- $\alpha$ -Mannosidase* (*MAN1B1*) 68,77 %  $\pm 20,38$  % und der *UDP-Xylose/UDP-N-Acetylglucosamin-Transporter* (*SLC35B4*) 92 %  $\pm 26,21$  % reduziert. Zusammenfassend zeigte dies eine generelle Runterregulation von an den N-Glykosylierung beteiligten Proteinen im gesamten Golgi-Apparat.



**Abb.5.5.: qRT-PCR verschiedener N-glykosylierungsrelevanter Proteine.** Es wurde gegen *RAB7A* normalisiert und die Kontrolle auf 100 % gesetzt. Im Vergleich des Patienten (n = 3) zur Kontrolle (n = 3) ergab sich vor allem eine Reduktion fast aller mRNA-Expressionslevel bis auf *ST3GAL2* mit eine Anstieg auf 244,33 % bei jedoch hoher Standardabweichung ( $\pm 140,13$  %).

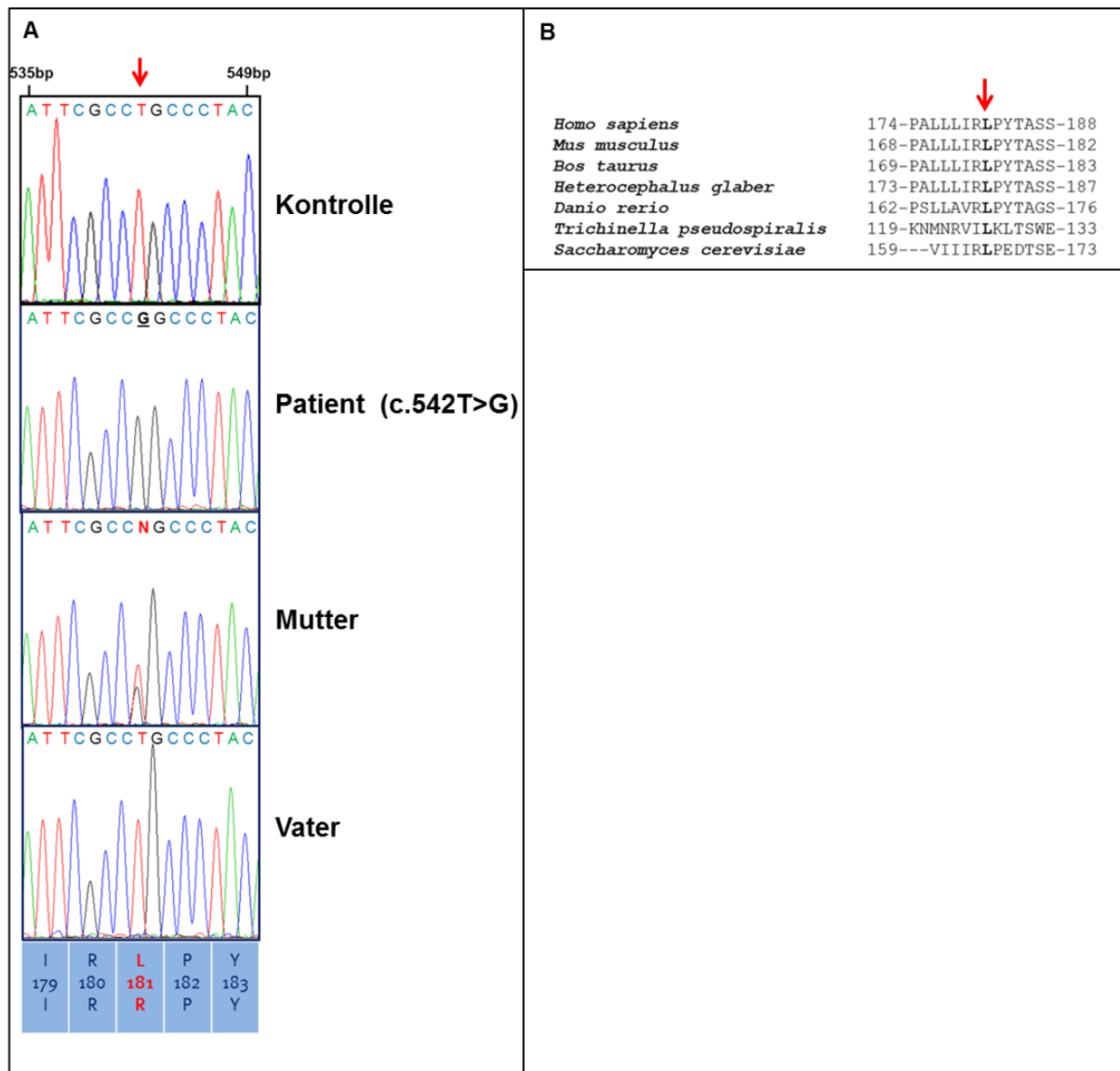
### **5.3. Molekularbiologische Untersuchungen der genetischen Mutation des CDG-Patienten**

#### **5.3.1. „Whole Exome Sequencing“ identifizierte eine hemizygote Mutation im *ATP6AP1*-Gen**

In Kollaboration mit dem Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) Heidelberg (AG Eils) wurde das Exom des Patienten mit Hilfe der Methode „Whole Exome Sequencing“ (WES) analysiert. Hierbei konnte die hemizygote Punktmutation c.542T>G im X-chromosomal lokalisierten *ATP6AP1*-Gen (Xq28) identifiziert werden.

#### **5.3.2. Sanger-Sequenzierung bestätigte die Punktmutation im *ATP6AP1*-Gen**

Durch Sanger-Sequenzierung konnte beim Patienten die Mutation (c.542T>G) im Exon 4 des Gens in hemizygoter Form sowie homozygot auf cDNA-Ebene bestätigt werden (Abb.5.6.A). Die Mutter des Patienten ist heterozygote Trägerin dieser Mutation, der Vater ist nicht betroffen. Die nachgewiesene Punktmutation führt im *ATP6AP1*-Protein zum Aminosäureaustausch p.L181R (Abb.5.6.B). Die Position der ausgetauschten Aminosäure kann keiner speziellen Domäne zugeordnet werden (UniProtKB - Q15904 (VAS1\_HUMAN)), ist jedoch von Mensch bis Hefe hochkonserviert und liegt zudem mittig in einem konservierten Bereich des jeweiligen Proteins.



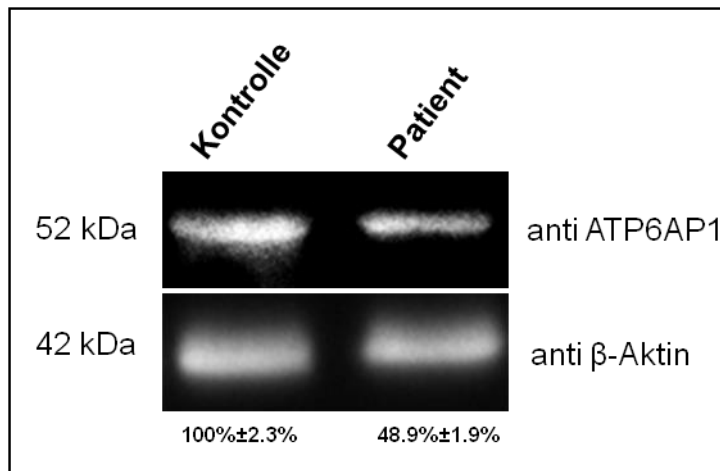
**Abb.5.6.: Hemizygoter Punktmutation im X-chromosomalen *ATP6AP1*-Gen und daraus resultierender Aminosäureaustausch in der Proteinsequenz.** A) Zur Bestätigung der Punktmutation durchgeführte Sanger-Sequenzierung des Exon 4 des *ATP6AP1*-Gens einer Kontrolle, des Patienten mit Mutation (c.542T>G) (siehe Pfeil) und der Eltern. B) Innerhalb der verschiedenen Spezies konservierter Aminosäuresequenzbereich mit der beim Patienten betroffenen Aminosäure (p.L181R) (siehe Pfeil).

## 5.4. Reduzierte *ATP6AP1*-Expression bei kontrollähnlicher Lokalisation

### 5.4.1. Verringertes *ATP6AP1*-Signal im Western Blot

Das Protein *ATP6AP1* wurde aus Fibroblastenlysat des Patienten im Vergleich zur Kontrolle mittels SDS-PAGE und anschließendem Western Blot analysiert. Die jeweiligen *ATP6AP1*-Signalintensitäten wurden mit Hilfe von  $\beta$ -Aktin als

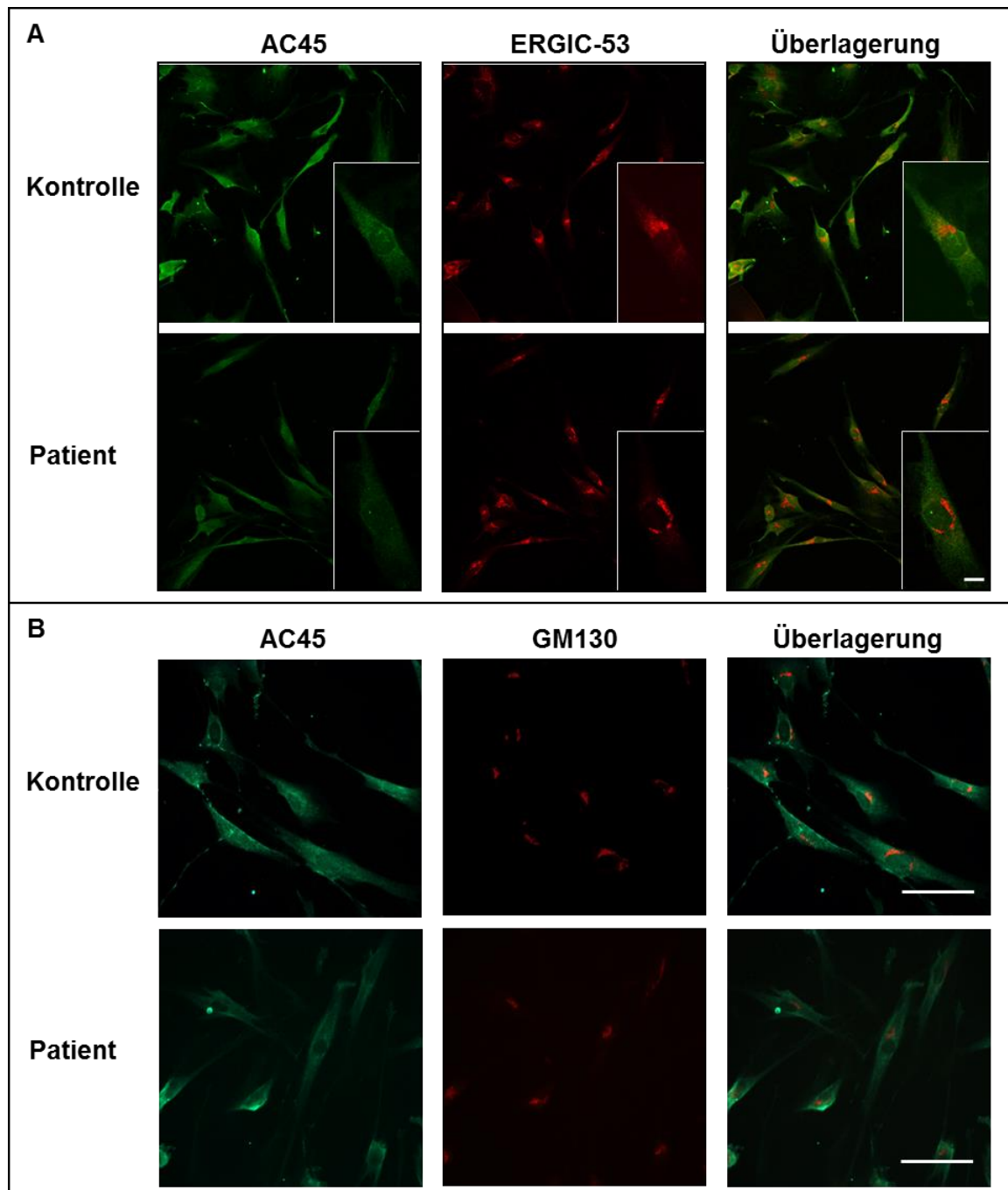
Ladekontrolle quantifiziert (Abb.5.7.). Im Falle des Patienten zeigte sich eine deutlich verminderte Proteinmenge von  $48,9\% \pm 1,9\%$  im Vergleich zur Kontrolle.



**Abb.5.7.: SDS-PAGE mit anschließender Western Blot-Analyse aus Zellextrakten des Patienten und einer alters- und geschlechtsgleichen Kontrollzelllinie.** Quantifizierung der Proteinmenge durch Ermittlung der Signalintensität der Western Blot Chemiluminiszenzaufnahme im Verhältnis zu  $\beta$ -Aktin. Detektion einer verringerten Signalintensität und damit reduzierten ATP6AP1-Proteinlevels im Patienten.

#### **5.4.2. Abgeschwächtes ATP6AP1-Immunofluoreszenzsignal bei kontrollähnlicher Lokalisation**

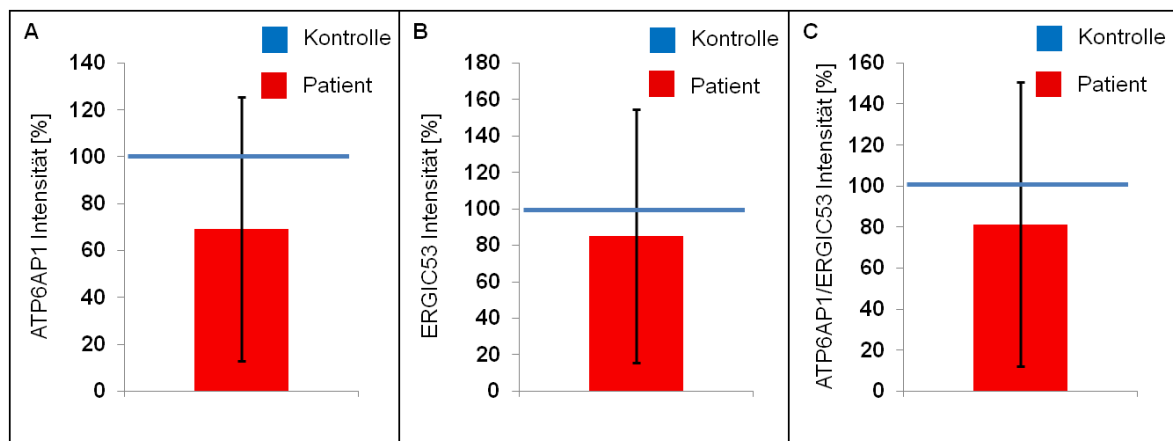
Zur weiterführenden Untersuchung des Proteins und seiner Lokalisation wurden Kontroll- und Patientenfibroblasten immunohistochemisch analysiert (Abb.5.8.). Neben ATP6AP1 wurden das Markerprotein ER-Golgi-Intermediär-Kompartiment-53 kDa-Protein (ERGIC-53) (Abb.5.8.A) sowie das *cis*-Golgi-Matrix-130 kDa-Protein (GM130) (Abb.5.8.B) eingesetzt. Vergleichbar mit der Kontrolle zeigte sich beim Patienten eine Verteilung von ATP6AP1 über die gesamte Zelle. Weiterhin war eine Kolokalisation mit ERGIC-53 ersichtlich, wohingegen sich keine Kolokalisation mit GM130 zeigte. Zudem war die Fluoreszenzsignalstärke von ATP6AP1 bei dem Patienten schwächer als in der Kontrolle.



**Abb.5.8.: Immunohistochemische Mikroskopieaufnahmen von Fibroblasten des Patienten und einer Kontrolle.** A) Dargestellt sind die Zellen bei 20x Vergrößerung. Weiß eingerahmt jeweils eine Einzelzelle bei 63x Vergrößerung (weißer Balken 10 µm). ATP6AP1 (in Grün) wurde mit dem Fluorophor GFP (links) detektiert und ERGIC-53 (in Rot) mit RFP (Mitte). Die Signalintensität von ATP6AP1 der Patientenzellen war schwächer im Vergleich zu den Kontrollzellen. Durch Überlagerung der Farbkanäle zeigte sich die Kolokalisation von ATP6AP1 und ERGIC-53 in Gelb (rechts). B) Dargestellt sind Fibroblasten des Patienten und der Kontrolle bei 40x Vergrößerung (weißer Balken 100 µm). Weder bei Patienten- noch den Kontrollzellen zeigte sich eine Kolokalisation von ATP6AP1 und GM130.

Bei Messungen der Signalintensität des ATP6AP1- und ERGIC-53-Proteins in den Fluoreszenzaufnahmen wurden die Ergebnisse der Kontrollfibroblasten (n = 5) auf 100 % gesetzt. Somit ergab sich in den Patientenfibroblasten (n = 4) eine verringerte Signalintensität von ATP6AP1 auf 69,2 % ± 56,35 % und ebenfalls von ERGIC-53

auf  $85,12 \% \pm 69,71 \%$  (Abb.5.9.A, B). Das Signal des ERGIC-53-Proteins diente hier als Kontrolle. Wurden nun die Intensitäten des Fluoreszenzsignals von ATP6AP1 und ERGIC-53 ins Verhältnis gesetzt und das Verhältnis aus der Kontrollzelllinie auf 100 % gesetzt, zeigten auch hier die Patientenzellen eine Abnahme auf  $81,35 \% \pm 69,39 \%$  (Abb.5.9.C) und somit also eine Reduktion des ATP6AP1-Proteinsignals im Vergleich zur Kontrolle.

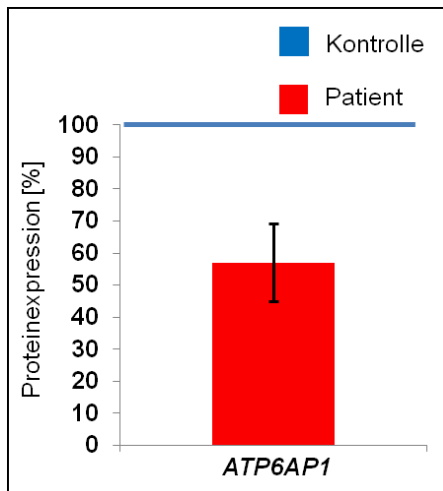


**Abb.5.9.: Quantifizierung der ATP6AP1-Signalintensität in den immunohistochemischen Aufnahmen der Patienten- und Kontrollfibroblasten.** Die Quantifizierung der Fluoreszenzintensität erfolgte in Abhängigkeit zur Zellzahl und der Fläche. Die Ergebnisse der Kontrolle (n = 5) wurden auf 100 % gesetzt und die Signalintensitäten der Patientenfibroblasten (n = 4) dagegen verglichen. A) Reduzierte Signalintensität von ATP6AP1 in den Patientenfibroblasten im Vergleich zur Kontrollzelllinie. B) Reduzierte Signalintensität von ERGIC-53 in den Patientenfibroblasten im Vergleich zur Kontrollzelllinie. C) Quantifizierung von ATP6AP1 gegen die Kontrolle ERGIC-53 zeigte eine verminderte ATP6AP1-Signalintensität im Patienten.

#### 5.4.3. Verminderte mRNA-Expression von *ATP6AP1*

Nachdem beim eine reduzierte Proteinmenge sowohl durch eine Western Blot-Analyse als auch immunohistochemisch nachgewiesen werden konnte, sollte überprüft werden, ob sich die Mutation (c.542T>G) bereits auf mRNA-Ebene auswirkt. Hierzu wurde die RNA-Expression des betroffenen *ATP6AP1*-Gens in Patientenfibroblasten mit der quantitativen Echtzeit PCR („quantitative realtime PCR“, qRT-PCR) analysiert. Im Vergleich zur Kontrolle und normalisiert gegen *RAB7A* ergab sich beim Patienten eine Reduktion auf  $57,06 \% \pm 12,06 \%$  (Abb.5.10.).



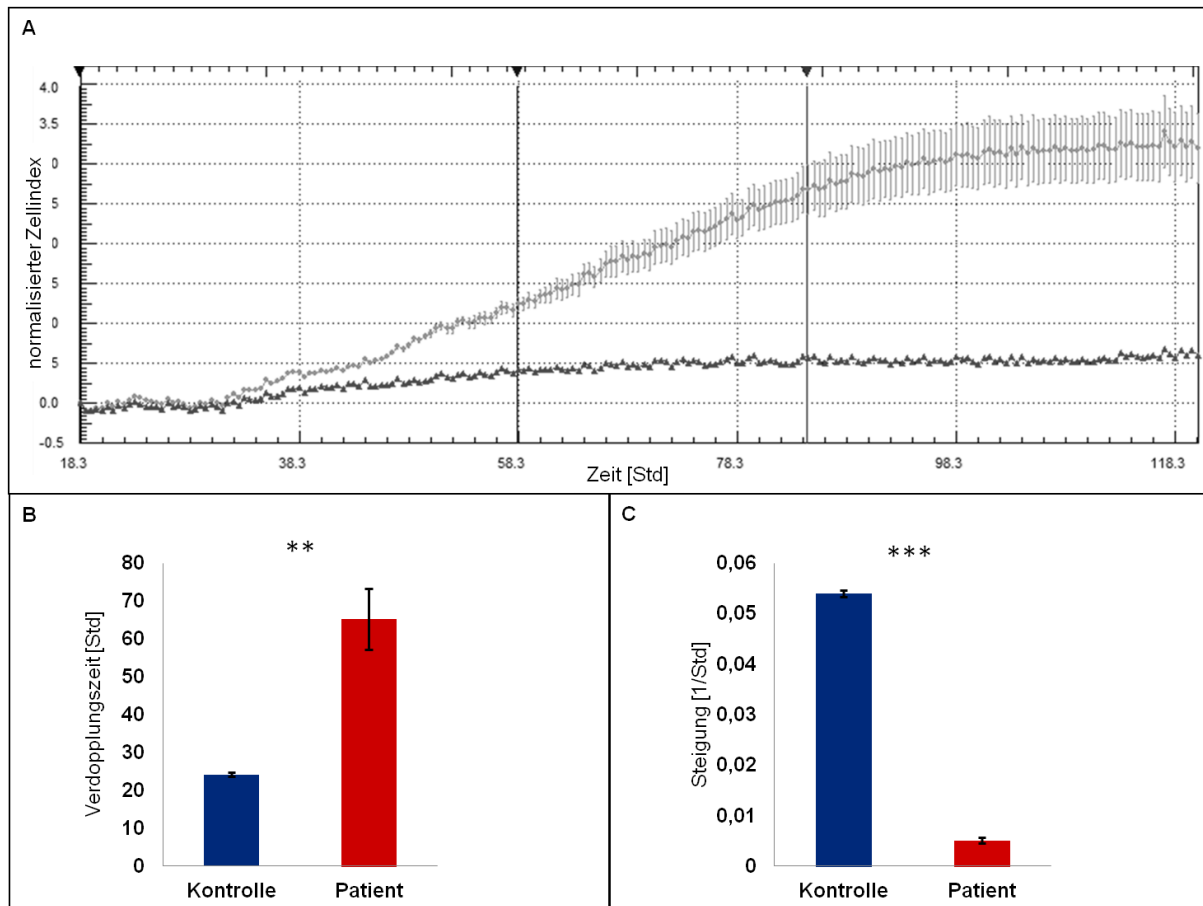


**Abb.5.10.: qRT-PCR von *ATP6AP1* des Patienten im Vergleich zur Kontrolle.** Es wurde gegen *RAB7A* normalisiert und die Kontrolle (n = 3) auf 100 % gesetzt. Im Vergleich des Patienten (n = 3) zur Kontrolle ergab sich eine Reduktion der mRNA-Expression von *ATP6AP1*.

## 5.5. Zelluläre Anomalien der *ATP6AP1*-defizienten Fibroblasten

### 5.5.1. Verlangsamtes Zellwachstum bei verlängerter Proliferationszeit

Während der Arbeit mit den Patientenfibroblasten fiel im Vergleich zur Kontrolle ein durchweg langsames Zellwachstum auf. Um diese Beobachtung näher zu charakterisieren wurde das Wachstum der Patienten- und Kontrollzellen mit dem „xCELLigence“ Gerät in Echtzeit für 120 Stunden (h) gemessen (Abb.5.11.). Die Kontrollzellen erreichten nach ca. 100 h ihr Plateau (Konfluenz), wohingegen das Wachstum der Patientenzellen stark reduziert war und der Zellindex nahezu stagnierte (Abb.5.11.A). Bei den Kontrollzellen ergab sich eine Verdopplungszeit von  $24,2 \text{ h} \pm 0,5 \text{ h}$ , wohingegen die Zellen des Patienten mit  $65,2 \text{ h} \pm 0,5 \text{ h}$  (\*\*  $p \leq 0,0021$ ) signifikant länger benötigten (Abb.5.11.B). Umgekehrt verhielt es sich hingegen bei der Proliferation der Zellen, die im Vergleich zur Kontrolle ( $100 \% \pm 0,06 \%$ ) beim Patienten signifikant auf  $9,4 \% \pm 0,06 \%$  (\*\*\*)  $p \leq 0,0003$ ) erniedrigt war (Abb.5.11.C).



**Abb.5.11.: Zellwachstum und Proliferation der Fibroblasten des Patienten und einer Kontrolle in Echtzeitmessung.** Gemessen wurde 120 h unter normalen Zellwachstumsbedingungen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. A) Darstellung des auf die Basislinie normalisierten Zellindex. Die hellgraue Linie stellt die Kontrolle dar, die dunkelgraue den Patienten. Durch Pfeile und je eine vertikale Linie eingerahmt ist die für die Berechnung von Verdopplungs- und Proliferationszeit verwendete lineare Steigung. B) Signifikant erhöhte Verdopplungszeit der Fibroblasten des Patienten, was mit der flachen Steigung und damit signifikant erniedrigten Zellproliferation einhergeht C).

### 5.5.2. Veränderte Aminosäurewerte im Serum und Fibroblasten

Da sich Veränderungen im Zellwachstum u.a. auch auf einen entgleiten Aminosäurestoffwechsel zurückführen lassen können, wurden die Aminosäuren des Patienten im Serum sowie in Fibroblastenextrakten analysiert (Abb.5.12.). Im Serum des Patienten (n = 4) (Abb.5.12.A) zeigten sich deutliche Veränderungen bei den einzelnen Aminosäuren im Vergleich zu Kontrollseren (n = 4), deren Wert als Referenz auf 100 % gesetzt wurde. Der größte Anstieg wurde bei der essentiellen Aminosäure Threonin (Thr) gemessen 191,2 % ± 7,68 %. Weiterhin waren Ornithin (Orn) (137,34 % ± 6,16 %), Glycin (Gly) (134,46 % ± 5,14 %), Phenylalanin (Phe) (132,68 % ± 12,71 %), Leucin/Isoleucin (Leu/Ile) (128,44 % ± 12,1 %) und Tryptophan (Trp) (128,32 % ± 25,71 %) erhöht. Zusätzlich zeigten Tyrosin (Tyr) mit 126,55 % ± 10,44 %, Alanin (Ala) (123,1 % ± 5,17 %), Prolin (Pro) (120,1 % ± 6,33 %), Arginin (Arg) mit 119,73 % ± 10,07 % und Methionin (Met) (101,77 % ± 20,17 %)

erhöhte Werte. Zu den Aminosäuren mit erheblich reduzierten Mengen gehörten Glutaminsäure (Glu) mit nur noch  $20,31 \% \pm 15,46 \%$ , Argininosuccinat (Asa)  $23,68 \% \pm 5,65 \%$  und Asparagin (Asp)  $26,59 \% \pm 15,23 \%$ . Weitere verminderte Aminosäuren im Patienten waren Glutamin (Gln) mit  $75,43 \% \pm 16,83 \%$ , Valin (Val) ( $81,43 \% \pm 14 \%$ ), Homocitrullin (Hci) ( $88,16 \% \pm 12,2 \%$ ) und Histidin (His) ( $87,75 \% \pm 27,57 \%$ ) sowie geringfügig Citrullin (Cit) mit  $94,54 \% \pm 4,88 \%$ .

Im Vergleich zu den Ergebnissen des Serums ergab sich bei der Bestimmung in den Fibroblasten eine generelle Reduktion der Aminosäuren im Patienten ( $n = 4$ ) im Vergleich zur Kontrolle ( $n = 5$ ) (Abb.5.12.B). Ausnahme stellten hier Met und Trp dar, welche auf  $115,83 \% \pm 22,13 \%$  und  $108,11 \% \pm 6,39 \%$  anstiegen. Den niedrigsten Wert zeigten Asa ( $47,11 \% \pm 19,96 \%$ ), Hci ( $54,92 \% \pm 24,32 \%$ ), Ala ( $59,57 \% \pm 24,74 \%$ ) und Cit mit  $60,89 \% \pm 11,06 \%$ . Schwache Minderungen waren im Falle von Gly ( $98,19 \% \pm 2,01 \%$ ) und Pro ( $98,08 \% \pm 12,21 \%$ ) zu sehen, sowie bei Tyr ( $93,1 \% \pm 10,11 \%$ ), His ( $92,34 \% \pm 10,07 \%$ ), Gln ( $92,06 \% \pm 8,45 \%$ ), Glu ( $91,18 \% \pm 11,66 \%$ ), Val ( $88,97 \% \pm 7,57 \%$ ), Phe mit  $79,63 \% \pm 30,99 \%$ , Leu/Ile ( $78,83 \% \pm 9,87 \%$ ), Orn mit  $73,24 \% \pm 26,59 \%$ , Thr ( $72,22 \% \pm 21,62 \%$ ;  $** p \leq 0,0048$ ) und Asp ( $65,02 \% \pm 9,1 \%$ ) (Tab.8.3. und Tab.8.4.).

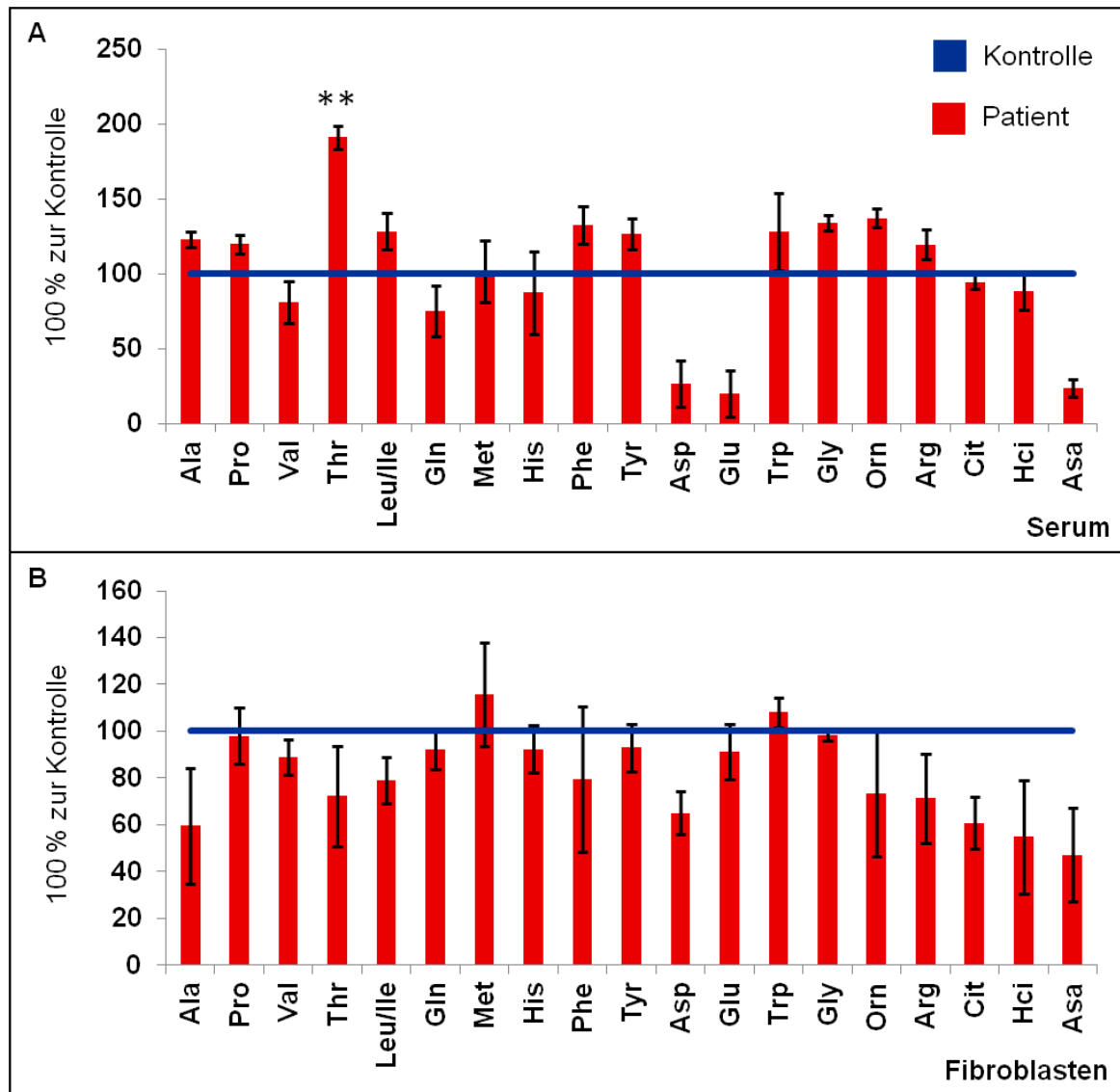
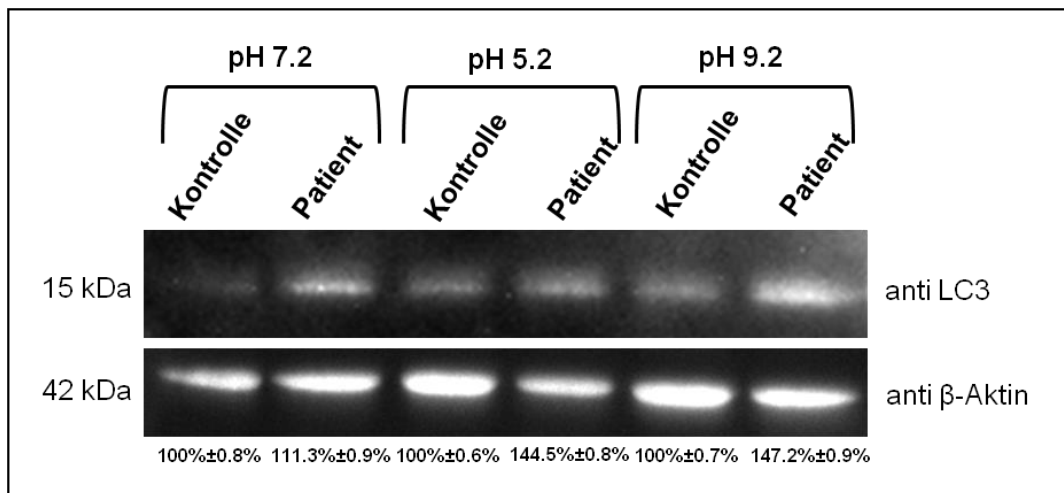


Abb.5.12.: Mit Hilfe der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie bestimmte Aminosäurelevel im Serum und Fibroblastenlysat. Die Kontrollen wurde auf 100 % gesetzt und die Ergebnisse des Patienten dagegen verglichen. A) Veränderungen der Aminosäurelevel im Serum des Patienten, angegeben in Prozent. B) Veränderungen der Aminosäurelevel aus Zelllysaten, angegeben in Prozent.

### 5.5.3. pH-Wert-abhängiger Anstieg des Mikrotubuli-assoziierten Proteins 1A/1B „light chain“ 3 im Western Blot

Da die *ATP6AP1*-Mutation einen erheblichen Einfluss auf die Zellproliferation des Patienten hatte, wurde in der nachfolgenden Untersuchung überprüft, ob dies im Zusammenhang mit einer erhöhten Autophagie stand. Hierzu wurde das Markerprotein Mikrotubuli-assoziiertes Protein 1A/1B „light chain“ 3 (LC3) mittels Western Blot im Zelllysat von Patienten- und Kontrollfibroblasten nach 24-stündiger Inkubation unter Standard- (pH 7,2) bzw. Stressbedingungen (pH 5,2 und pH 9,2) überprüft (Abb.5.13.). Bereits bei neutralem pH-Wert zeigte sich mit  $111,3 \% \pm 0,9 \%$  ein erhöhtes Vorliegen des Autophagiemarkers im Vergleich zur Kontrolle. Die

Veränderungen des pH-Werts des Mediums in den sauren und auch basischen Bereich führten beim Patienten zu einer verstärkten Expression von LC3 bis auf  $144,5 \% \pm 0,8 \%$  (pH 5,2) bzw.  $147,2 \% \pm 0,9 \%$  (pH 9,2).

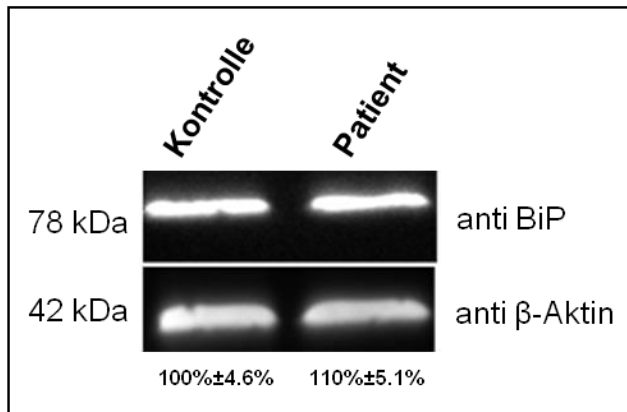


**Abb.5.13.: Western Blot des Autophagiemarkers LC3 im Zelllysate aus Kontroll- und Patientenfibroblasten bei Inkubation der Fibroblasten in Medium unterschiedlichen pH-Werts.** Die Quantifizierungen gegen  $\beta$ -Aktin ergab bei einem neutralen pH-Wert ein erhöhtes LC3-Signal bei den Patientenzellen im Vergleich zur Kontrolle. Dieser Effekt konnte durch Stressen der Zellen, durch Verschiebung des pH-Werts des Zellkulturmediums, in den basischen sowie sauren Bereich noch verstärkt werden.

Im Anschluss erfolgten Untersuchungen zum zellulären pH-Wert der Patientenfibroblasten im Vergleich zu Kontrollfibroblasten. Hierbei zeigte die Färbung der Zellen mit dem Farbstoff Acridinorange, dessen emittierte Wellenlänge sich pH-abhängig verändert, und die anschließende Durchflusszytometrie keine Auffälligkeiten.

#### 5.5.4. Leicht erhöhtes Signal des Immunoglobulin „heavy chain“ Bindeproteins im Western Blot

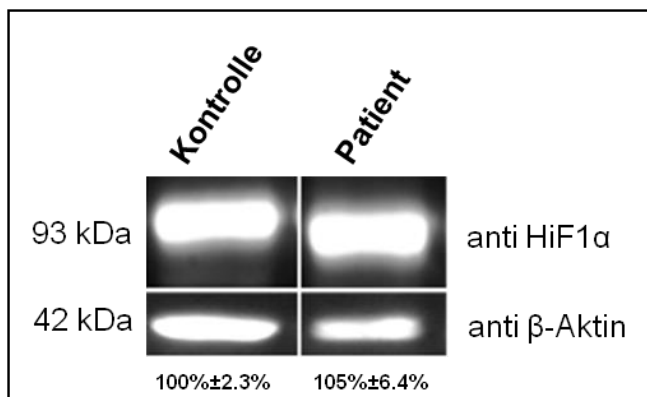
Aufgrund ihres veränderten Proliferationsverhaltens wurden die Patientenzellen nachfolgend auch auf Vorliegen von ER-Stress überprüft. Diese Untersuchung erfolgte mit Hilfe des ER-Stressmarkers Immunoglobulin „heavy chain“ Bindeprotein (BiP). Hier ergab sich im Vergleich zur Kontrolle ( $100 \% \pm 4,6 \%$ ) beim Patienten eine leichte Erhöhung auf  $110 \% \pm 5,1 \%$  (Abb.5.14.).



**Abb.5.14.:** Western Blot des ER-Stressmarkers BiP im Zelllysate aus Kontroll- und Patientenfibroblasten. Die Quantifizierung von BiP gegen die Ladekontrolle  $\beta$ -Aktin im Western Blot ergab einen leichten Anstieg des Markersignals beim Patienten im Vergleich zur Kontrolle.

### 5.5.5. Kontrollähnliches Signal des Hypoxie induzierten Faktors $\alpha$ im Western Blot

Weiterhin wurde auch ein potentieller Einfluss des mutierten ATP6AP1 auf die Mitochondrien in den Patientenfibroblasten, aufgrund der veränderten Zellproliferation, untersucht. Die Quantifizierung des Western Blots ergab mit 105 %  $\pm$  6,4 % eine nahezu kontrollähnliche Expression des mitochondrialen Markers Hypoxie induzierter Faktor  $\alpha$  (HiF1 $\alpha$ ) (Abb.5.15.).

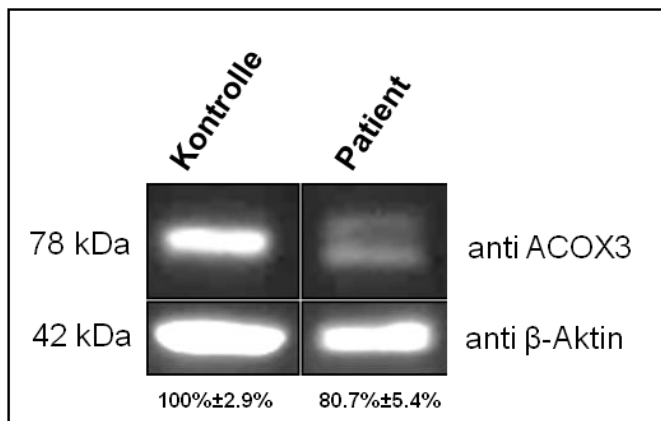


**Abb.5.15.:** Western Blot des mitochondrialen Markers HiF1 $\alpha$  im Zelllysate aus Kontroll- und Patientenfibroblasten. Die Quantifizierung von BiP gegen die Ladekontrolle  $\beta$ -Aktin im Western Blot zeigte eine kontrollähnliche Expression des Markerproteins beim Patienten.

## 5.6. Defekte in der peroxisomale $\beta$ -Oxidation der Patientenfibroblasten

### 5.6.1. Reduziertes Signal der Acyl-CoA Oxidase 3 im Western Blot

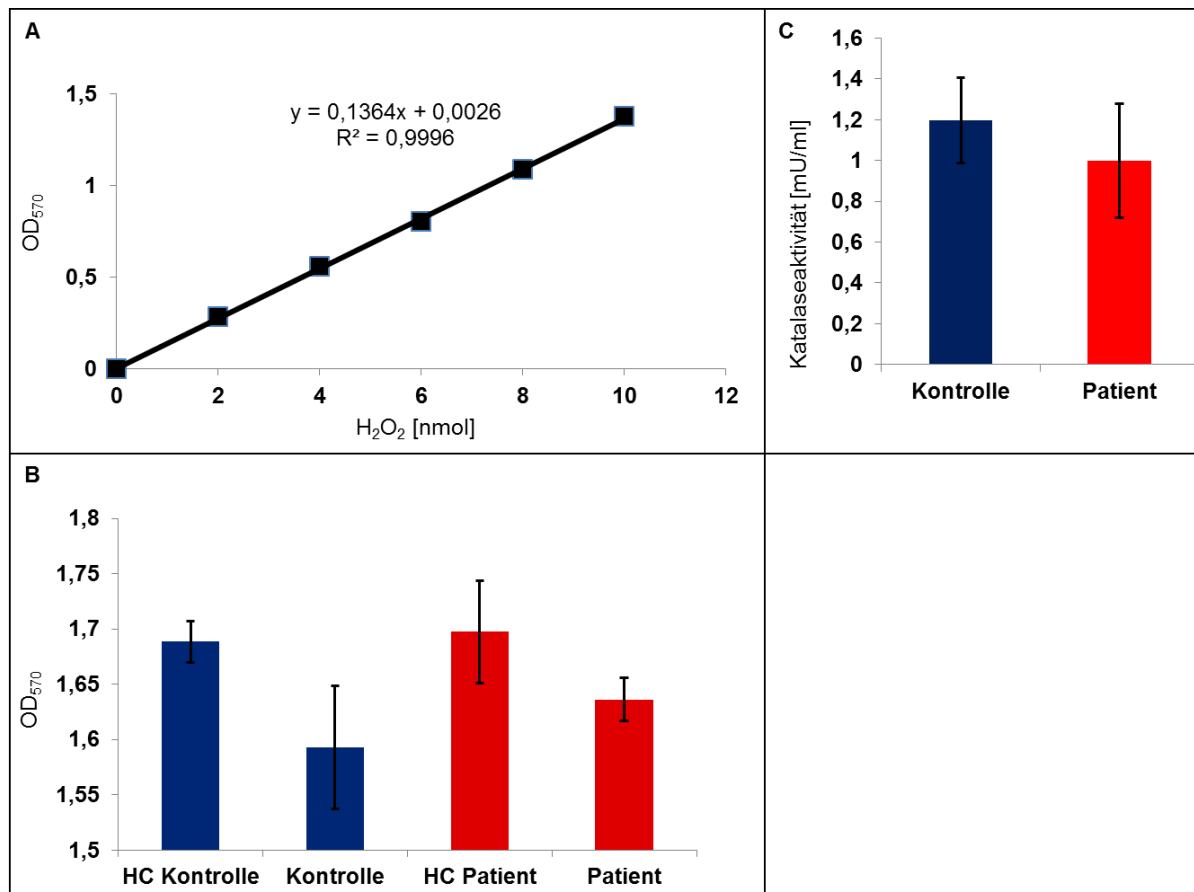
Da die ATP6AP1-Defizienz einen erheblichen Einfluss auf die Zellproliferation des Patienten hatte, wurde in nachfolgenden Untersuchungen überprüft, ob dies eventuell im Zusammenhang mit peroxisomalen Veränderungen stand. Die Analyse des peroxisomalen Markers Acyl-CoA Oxidase 3 (ACOX3) mittels Western Blot ergab eine Reduktion auf  $80,7 \% \pm 5,4 \%$  in den Patientenfibroblasten im Gegensatz zur Kontrolle ( $100 \% \pm 2,9 \%$ ) (Abb.5.16.).



**Abb.5.16.: Western Blot des peroxisomalen Markers ACOX3 des Patienten und der Kontrolle.** Die Quantifizierung des Markers ACOX3 gegen die Ladekontrolle  $\beta$ -Aktin zeigte im Zelllysat des Patienten eine Minderung des Proteinsignals im Vergleich zur Kontrolle.

### 5.6.2. Verringerte Katalaseaktivität der Peroxisomen

Die detektierte, verringerte Expression von ACOX3 beim Patienten ließ einen peroxisomalen Defekt vermuten. Zur weiteren Verifizierung wurde daher nachfolgend das Enzym Katalase, welches im entsprechenden Organell für die Umsetzung des Zellgifts Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) zu Wasser und Sauerstoff verantwortlich ist, analysiert. Die Messungen von Patient und Kontrolle wurden bei 570 nm durchgeführt, einschließlich der dazugehörigen „high control“ (HC), welche als Negativkontrolle nicht vorhandener Katalaseaktivität diente. Hier ergaben sich für den Patienten generell erhöhte Messwerte ( $OD_{570} \text{ (HC Patient)} 1,7 \pm 0,056$ ,  $OD_{570} \text{ (Patient)} 1,64 \pm 0,02$ ) im Vergleich zur Kontrolle ( $OD_{570} \text{ (HC Kontrolle)} 1,69 \pm 0,019$  und  $OD_{570} \text{ (Kontrolle)} 1,59 \pm 0,046$ ). Schließlich wurde daraus folgende Katalaseaktivitäten  $1 \text{ mU/ml} \pm 0,28 \text{ mU/ml}$  des Patienten und  $1,2 \text{ mU/ml} \pm 0,21 \text{ mU/ml}$  der Kontrolle berechnet. Somit zeigte der Patient eine um ca. 16,5 % erniedrigte Enzymaktivität (Abb.5.17.).



**Abb.5.17.: Bestimmung der Katalaseaktivität in Fibroblasten.** Die photometrischen Messungen wurden bei einer OD von 570 nm für 30 min durchgeführt. Die „high control“ (HC) entspricht der schon vor Messbeginn abgebrochenen Katalasereaktion und dient als Kontrolle des nicht umgesetzten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A) Darstellung der gemessenen Eichgerade, verwendet zur Berechnung der Katalaseaktivität. B) Darstellung der OD<sub>570</sub> Messungen von Kontrolle und Patient mit erhöhtem Wert im Falle des Patienten. C) Katalaseaktivität der Fibroblasten angegeben in mU/ml mit reduzierter Katalaseaktivität in Patientenzellen.

## 5.7. Metabolische Veränderungen im Serum und Fibroblasten des ATP6AP1-CDG Patienten

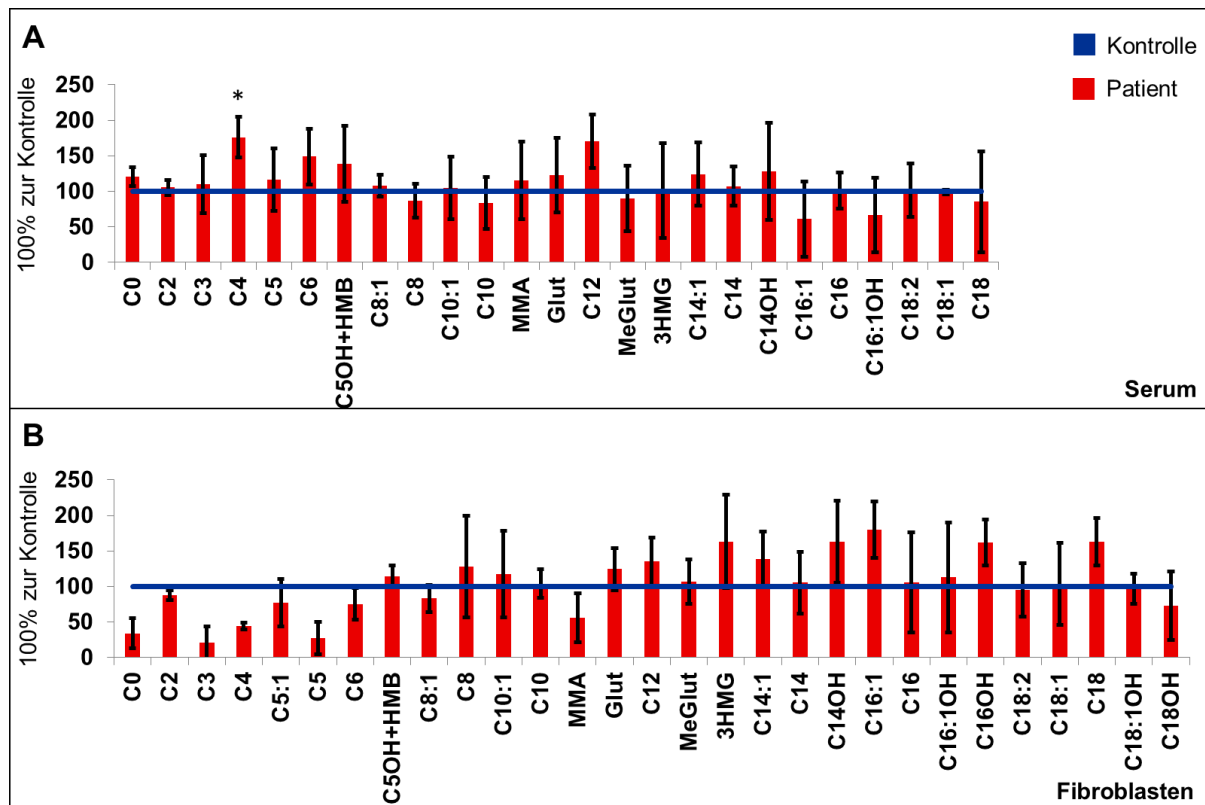
### 5.7.1. Unterschiedliche Acylcarnitinwerte im Serum und Fibroblasten

Aufgrund der Auffälligkeiten bei ACOX3 und der Katalase konzentrierten sich die Untersuchungen im weiteren Verlauf auf die Peroxisomen. Da ACOX3 hier für den ersten Schritt der  $\beta$ -Oxidation von langkettigen, verzweigten Fettsäuren verantwortlich ist, wurden zunächst die Acylcarnitine im Serum und in Zelllysaten massenspektrometrisch ermittelt (Abb.5.18.; Tab.8.3.; Tab.8.4.). Im Vergleich zu den Kontrollseren (n = 4) ergab sich beim Patienten (n = 4) eine tendenzielle Reduktion langkettiger Acylcarnitine (C16:1 bis C18) (Abb.5.18.A). Das Hexadecenoylcarnitin (C16:1) und das Hydroxyhexadecenoylcarnitin (C16:1OH) zeigten die niedrigsten Werte bis auf 61,07 % mit einer jedoch sehr hohen Standardabweichung von  $\pm 52,92$



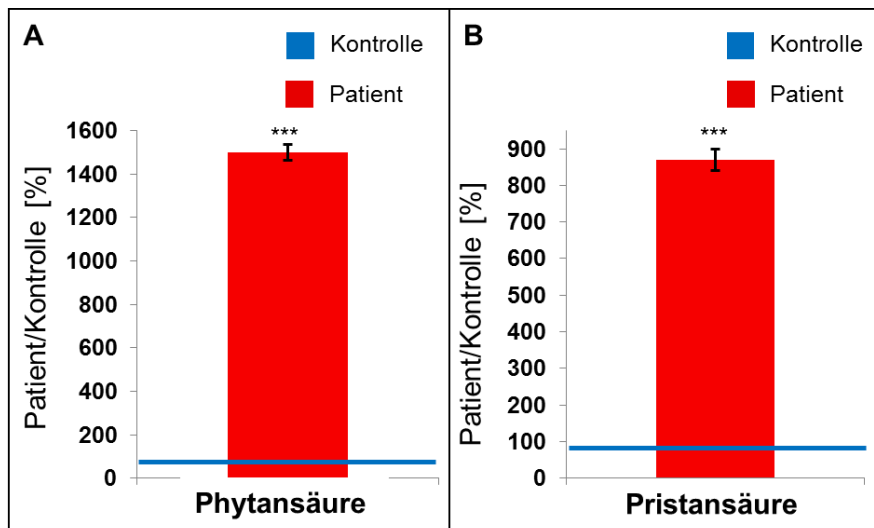
% für C16:1, und  $66,56 \% \pm 52,92 \%$  für C16:1OH. Weiterhin konnten erniedrigte Acylcarnitinwerte des C8, C10, MeGlut, C18:1 und C18 festgestellt werden. Kontrollähnliche Werte wurden für 3MG, C16 und C18:2 gemessen. Dahingegen waren Butyrylcarnitin (C4) mit  $176 \% \pm 28,46 \%$  (\*  $p \leq 0,03$ ) und Dodecanoylcarnitin (C12) mit  $170,53 \% \pm 37,35 \%$  am stärksten erhöht. Des Weiteren zeigten die Spezies C0 bis C18:1, C10:1, MMA, Glut, C14:1 und C14 einen Anstieg (Tab.8.3.; Tab.8.4.)

In den Fibroblasten des Patienten ( $n = 4$ ) beobachtete man dagegen eine allgemeine Reduktion kurzkettiger (C0 bis C6) sowie ein Anstieg einiger mittel- und langkettiger Acylcarnitine (C5OH+HMB bis C18) im Gegensatz zur Kontrolle ( $n = 5$ ) (Abb.5.18.B). Eine besonders auffällige Reduktion wurde bei Propionylcarnitin (C3) ( $21,14 \% \pm 22,75 \%$ ), Valerylarnitin (C5) ( $27,72 \% \pm 22,72$ ) und Acetylcarnitin (C0) ( $33,81 \% \pm 21,29 \%$ ) detektiert. Im Gegensatz dazu wiesen C16:1 mit  $180,13 \% \pm 39,43 \%$ , 3-Hydroxymethylglutaryl (3HMG) ( $163,42 \% \pm 6,08 \%$ ), 3-OH-Tetradecanoylcarnitin (C14OH) ( $163,01 \% \pm 58,25 \%$ ), Octadecanoylcarnitin (C 18) ( $162,74 \% \pm 33,23 \%$ ) und Hydroxyhexadecanoylcarnitin (C16OH) ( $162 \% \pm 32,66 \%$ ) eine deutliche Erhöhung auf (Tab.8.3.; Tab.8.4.).



**Abb.5.18.: Massenspektrometrische Analyse der Acylcarnitine im Serum und Fibroblastenlysaten.** Die Kontrollen wurden auf 100 % gesetzt und die Ergebnisse des Patienten dagegen verglichen. A) Veränderungen der Acylcarnitine im Patientenserum, angegeben in Prozent, zeigten eine Erhöhung einiger kurz- und mittelkettiger Acylcarnitine. B) Veränderungen der Acylcarnitinlevel aus Zelllysate, angegeben in Prozent. Im Patienten wurde vor allem eine Reduktion kurzkettinger und ein Anstieg mittel- bis langkettiger Acylcarnitine detektiert.

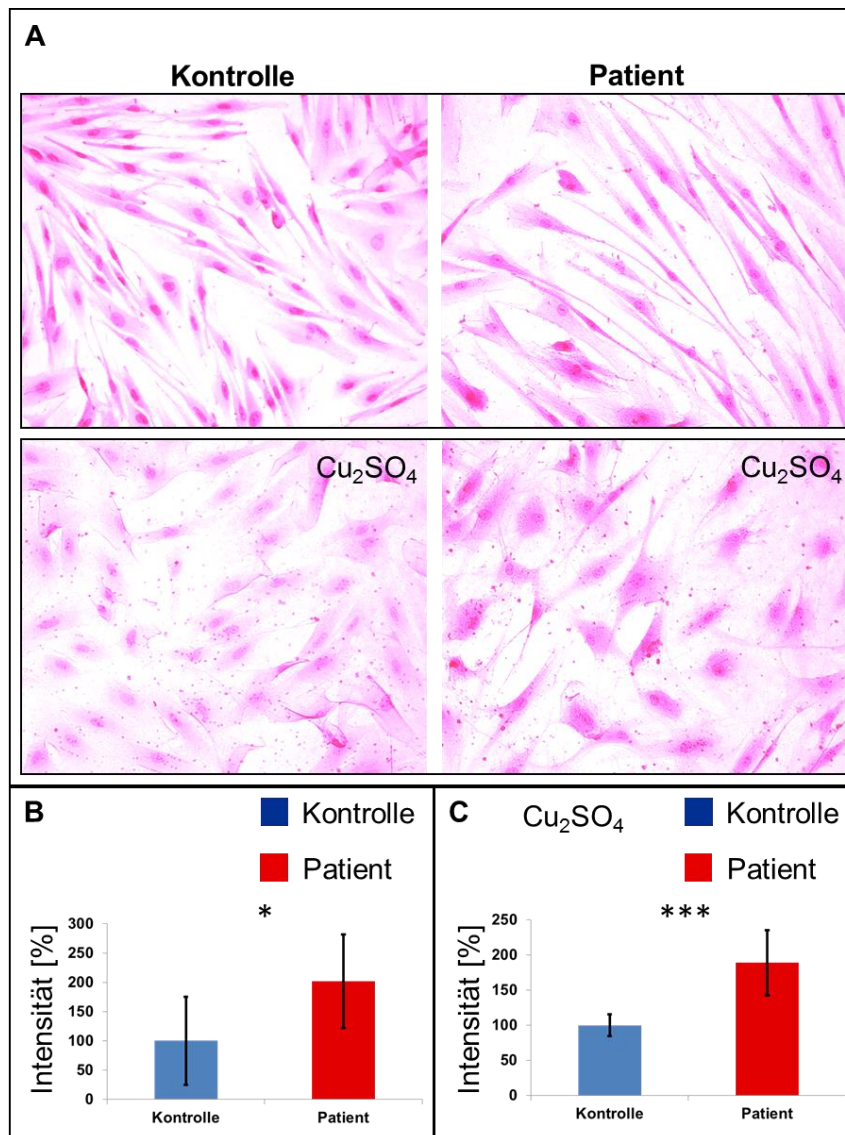
Neben der mittel- bis langkettigen Fettsäuren wurde im Zelllysate des Patienten auch eine Anreicherung der sehr langkettigen, verzweigten, gesättigten Fettsäuren, der Phytansäure und, des Abbauzwischenprodukts, der Pristansäure nachgewiesen (Abb.5.19.). Im Vergleich zu Kontrollfibroblasten ergab sich für den Patienten ein signifikanter Anstieg der Phytansäure auf  $1498 \% \pm 37,3 \%$  (\*\* $p \leq 0,00002$ ) und der Pristansäure auf  $870 \% \pm 30 \%$  (\*\* $p \leq 0,0008$ ).



**Abb.5.19.:** Anreicherung der sehr langkettigen, verzweigten, gesättigten Fettsäuren, Pristan- und Phytansäure, in Patientenfibroblasten. Die Kontrolle wurde auf 100 % gesetzt und der Patient dagegen verglichen. A) Akkumulation der Phytansäure in Patientenzellen. B) Akkumulation der Pristansäure in Patientenzellen.

### 5.7.2. Zelluläre Anreicherung von Lipidtröpfchen

Nachdem im Patienten Veränderungen der Acylcarnitine sowohl im Serum als auch in Fibroblasten gefunden wurden, wurden die Patientenzellen im nächsten Schritt auf mögliche Lipidanomalien geprüft. Um zunächst einen grundlegenden Eindruck in Bezug auf die Lipidbildung in Patienten- und Kontrollzellen zu erhalten, erfolgte eine Färbung mit dem Farbstoff Oil-Red O zur Markierung von Triglyceriden. Hierfür wurden unbehandelte und für 24 h mit 250 mM  $\text{Cu}_2\text{SO}_4$  belastete Zellen verwendet ( $n = 7$ ) (Abb.5.20.). Nach Fixierung und Färbung der Zellen wurde die Intensität der Färbung abhängig von der Zellzahl bestimmt. Bereits ohne Supplementation (Abb.5.20.B) zeigten die Patientenzellen im Vergleich zur Kontrolle eine signifikant erhöhte Signalintensität auf 201,97 %, jedoch bei hoher Standardabweichung  $\pm 79,88$  % (\*  $p \leq 0,02$ ). Nach  $\text{Cu}_2\text{SO}_4$ -Belastung ergab sich in den Patientenzellen ein deutlich signifikanter Intensitätsanstieg auf 189,16 %  $\pm 46,59$  % (\*\*\*)  $p \leq 0,0002$ ), im Vergleich zur Kontrolle (100 %  $\pm 15,51$  %).

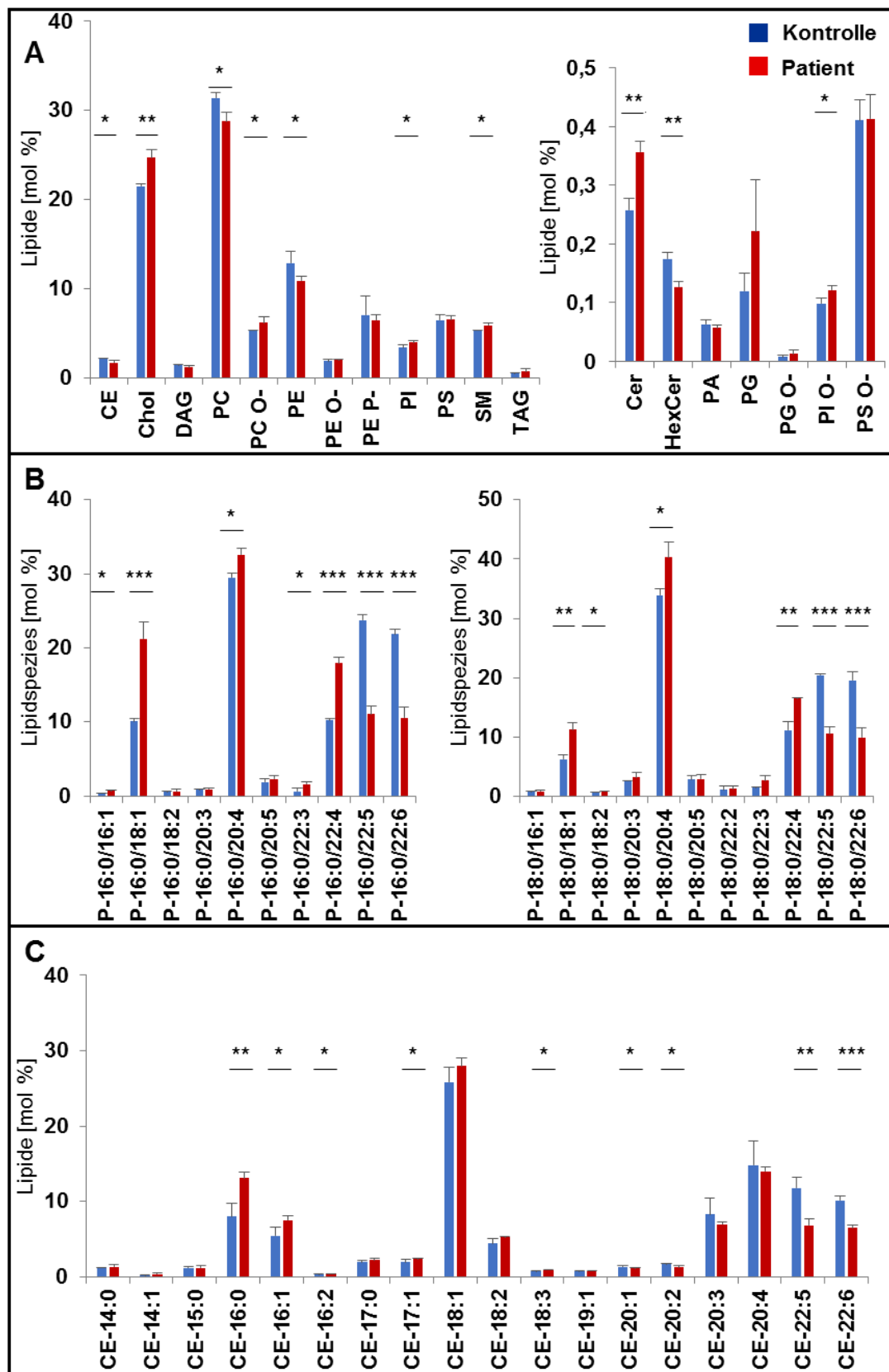


**Abb.5.20.: Färbung der Lipidtröpfchen in Patienten- und Kontrollfibroblasten vor und nach Cu<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Belastung.** A) Fixierte Fibroblasten nach Oil-Red O Färbung. Die oberen zwei Aufnahmen zeigen eine Kontrolle und den Patienten vor Inkubation mit Cu<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und die unteren zwei Aufnahmen Kontrolle als auch Patient nach 24-stündiger Inkubation mit 250 mM Cu<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>. B) Quantifizierung der Färbungsintensität des Oil-Red O Farbstoffs abhängig von Zellzahl und Fläche, in Prozent, mit einem nahezu doppelten Intensität in Patientenzellen. C) Quantifizierung der Färbungsintensität abhängig von Zellzahl und Fläche nach 250 mM Cu<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Supplementation, in Prozent, mit erhöhter Intensität des Patienten um nahezu das Doppelte.

### 5.7.3. Abweichende Lipidzusammensetzung in Patientenfibroblasten

Aufgrund der o.g. Ergebnisse aus den Fibroblasten nach Oil-Red O Färbung wurden in Kollaboration mit Britta Brügger (BZH, Heidelberg) Lipidomikuntersuchungen mittels Nanoelektronenspray-Ionisationstandemmassenspektrometrie durchgeführt. Gemessen wurden Lipide im Patienten- und den Kontrollzelllysate sowie Plasmalogene aus der Klasse der Cholesterylester (CE) (Abb.5.21.). Im Allgemeinen zeigte sich eine veränderte Lipidhomöostase, das bedeutet sowohl Anreicherungen als auch Reduktionen der detektierten Lipide des Patienten (n= 3) im Vergleich zu

den Kontrollen (n = 3) (Tab.8.5.). Besonders auffällig waren hierbei die signifikanten Veränderungen des Cholesterols (Chol), des Phosphatidylcholins (PC) und auch Phosphatidylethanolamins (PE), der Ceramide (Cer) und der Hexosylceramide (HexCer). Das Lipid Chol war auf 24,7 mol %  $\pm$  0,9 mol % (\*\* p  $\leq$  0,002) angestiegen, Cer auf 0,36 mol %  $\pm$  0,02 mol % (\*\* p  $\leq$  0,002) und Phosphatidylglycerol (PG) sogar um nahezu das Doppelte im Vergleich zur Kontrolle auf 0,22 mol %  $\pm$  0,09 mol % (p  $\leq$  0,065). Dagegen sanken PC auf 28,8 mol %  $\pm$  1,0 mol % (\* p  $\leq$  0,009), PE auf 10,9 mol %  $\pm$  0,5 mol % (\* p  $\leq$  0,03) und HexCer auf 0,13 mol %  $\pm$  0,01 mol % (\*\* p  $\leq$  0,003), signifikant (Abb.5.21.A). Bei den Plasmalogenen (P) (16:0 und 18:0) zeigten sich für den Patienten signifikant erhöhte Werte für die 18:1 (P-Petroselinensäure)-, 20:4 (P-Arachidonsäure)- und 22:4 (P-Docosadiensäure)-Spezies, in Kombination mit signifikant reduzierten Mengen der 22:5 (P-Clupanodonsäure)- und 22:6 (P-Cervonsäure)-Spezies (Abb.5.21.B). Weiterhin wurde eine Fehlregulation einiger CE-Metabolite zwischen CE-16:0 (CE-Palmitinsäure) und CE-22:6 (CE-Cervonsäure) detektiert (Abb.5.21.C; Tab.8.5.).



**Abb.5.21.: Zelluläre Lipidomikanalyse der Lysate aus Patienten- und Kontrollfibroblasten ermittelt über Nanoelektronenspray-Ionisationstandemmassenspektrometrie.** Paarig dargestellt ist immer das detektierte Lipid aus Kontrolle und Patient. Generelle Schwankungen in der Lipid-Homöostase des Patienten konnten festgestellt werden. A) Allgemeine Übersicht der Lipide [mol %] aus Kontrolle und Patient. B) Darstellung der Plasmalogene (P) verschiedener Lipidspezies [mol %]. C) Messungen unterschiedlicher Spezies aus der Klasse der Cholesterylester (CE). (Abbildung erstellt in Zusammenarbeit mit Britta Brügger.)

## 6. Diskussion

Angeborene Defekte in der Glykoproteinbiosynthese führen häufig zu einem multiorganischen Krankheitsbild mit oftmals einhergehenden schweren, neurologischen Auffälligkeiten. Diese Defekte werden unter der Erkrankungsgruppe „Congenital Disorders of Glycosylation“ (CDG) zusammengefasst.

### 6.1. Multisystemisches Krankheitsbild bei Defekten innerhalb der V-Typ H<sup>+</sup>-ATPase

Bislang sind Defekte in einem akzessorischen Protein und neun Untereinheiten des Multiproteinkomplexes der H<sup>+</sup>-ATPase beschrieben worden, wozu ATP6AP1, ATP6V0A2, ATP6V0A3, ATP6V0A4, ATP6V1A, ATP6V1B1 und ATP6V1E1 zählen. Weiterhin liegen Mutationen in den drei an der Assemblierung der Protonenpumpe beteiligten Faktoren VMA21, CCDC115 und TMEM199 vor [44 – 46]. Nicht alle diese Defekte werden mit einer Glykosylierungserkrankung, beziehungsweise den „Congenital Disorders of Glycosylation“ (CDG), in Zusammenhang gebracht. Lediglich bei Mutationen des *ATP6AP1*- (11 Patienten), *ATP6V0A2*- (21 Patienten), *ATP6V1A*- (3 Patienten) und *ATP6V1E1*-Gens (6 Patienten), CCDC115- (8 Patienten) und TMEM199-CDG (1 Patient) ist die Glykosylierung nachweislich gestört [44 – 47, 68, 69].

Der im Verlauf dieser Arbeit identifizierte Patient weist eine neue, hemizygote Mutation im „*ATPase H<sup>+</sup>-transporting lysosomal accessory protein 1*“ (*ATP6AP1*)-Gen auf, welches für AC45, ein akzessorisches Protein des Multiuntereinheitenkomplexes der V-Typ H<sup>+</sup>-ATPase, kodiert. Diese ATP-getriebene Protonenpumpe trägt zum Erhalt der pH-Homöostase in einer Zelle bei und dient damit der Aufrechterhaltung des korrekten Ablaufs zahlreicher, zellulärer Prozesse.

Bislang sind nur elf weitere männliche Patienten mit diesem CDG-Defekt identifiziert worden [47], bei denen sich phänotypische Übereinstimmungen mit unserem Patienten finden lassen. Hierzu zählen die Vergrößerung von Leber und Milz, immunologische Auffälligkeiten, muskuläre Hypotonie, erniedrigte Ceruloplasmin- und Kupferwerte im Blut sowie eine normale, neurologische Entwicklung. Durch unseren Patienten kommen die Symptome Cutis laxa, eine exokrine Pankreasinsuffizienz und mit Kreon therapierbare Durchfälle neu hinzu, was als

wichtige Erweiterung des klinischen Phänotyps von ATP6AP1-CDG aufgenommen werden sollte, um die Diagnosestellung von neuen CDG-Verdachtspatienten zu vereinfachen.

Beachtenswert ist, dass auch die anderen ATP6AP1-Patienten einen erniedrigten Kupfer- sowie Ceruloplasminspiegel aufwiesen. Kupfer wird über die Nahrung aufgenommen und an das in der Leber synthetisierte Plasmaprotein Ceruloplasmin gebunden. Ungefähr 90 % des Kupfers im Körper liegen in Verbindung mit Ceruloplasmin vor [70]. Möglicherweise steht der reduzierte Ceruloplasminwert im Blut des Patienten daher in direktem Zusammenhang mit der verminderten Menge an Kupfer. Es dient dem Körper als lebensnotwendiges Spurenelement und spielt in zahlreichen, physiologischen Vorgängen wie der Angiogenese oder der Neurotransmittersynthese eine wichtige Rolle. Kupferabhängige Prozesse findet man zudem in der mitochondrialen Atmungskette, wo es als wichtiges Ion für die Funktionalität der Cytochrom-c-Oxidase (COX) sowie für die Zink (Zn)-Superoxid Dismutase (SOD) fungiert. Beide Enzyme sind essentiell für den Schutz der Zelle vor den reaktiven Sauerstoffspezies („reactive oxygen species“, ROS). Interessanterweise wird Kupfer auch von der Lysyl-Oxidase benötigt, welche Kollagen der extrazellulären Matrix mit dem Bindegewebe vernetzt. Bei Patienten mit dem Menkes Syndrom und auch Morbus Wilson kommt es aufgrund eines Defekts innerhalb der kupfertransportierenden ATPasen (ATP7A und ATP7B) zu einer reduzierten Aktivität der Lysyl-Oxidase, der COX und der SOD [71 – 73]. Neben anderen Symptomen zeigen auch diese Patienten ein verminertes Kupfer- sowie Ceruloplasminvorkommen in Verbindung mit erhöhten Transaminasewerten (AST, ALT) und einer damit einhergehenden Hepatopathie. Betroffene mit dem Menkes Syndrom zeichnen sich zudem durch faltige und durchscheinende Haut mit reduzierter Elastizität aus [74], Symptome, wie sie auch bei unserem ATP6AP1-CDG Patienten beobachtet wurden.

Die bei unserem Patienten identifizierten Hautveränderungen könnten zudem im Zusammenhang mit seiner Pankreasinsuffizienz stehen. So werden auch in Patienten mit Pankreasinsuffizienz regelmäßig verminderte Werte der fettlöslichen Vitamine A, D, E und K gefunden [75]. Dies liegt vor allem an der reduzierten Produktion der Verdauungsenzyme des Pankreas, sodass Nährstoffe und auch Vitamine nicht ausreichend aufgenommen werden können. Interessant ist, dass für die Haut insbesondere die Vitamine A und D notwendig sind [76 – 78]. Vitamin D ist



allgemein für die Gesundheit und den Schutz der Haut essentiell, wohingegen Vitamin A der Austrocknung und Keratinisierung der Epithelzellen der Haut entgegenwirkt. Bezüglich des Cutis laxa Syndroms zeigte der ATP6AP1-CDG Patient in den ersten 14 Lebensmonaten eine erhebliche Besserung. Auch bei ATP6V0A2-, ATP6V1A- und ATPV1E1-CDG zeigte sich zwar eine stetige Abmilderung des Hautphänotyps, allerdings nicht in diesem Ausmaß. Da unser Patient bereits sehr früh oral Vitamingaben erhielt, könnte man hier einen Bezug zwischen Vitaminstatus und der Besserung des Hautphänotyps herstellen. Leider ist nicht bekannt, ob den anderen Patienten zusätzlich Vitamine gegeben wurden. Grundsätzlich könnte jedoch die ergänzende Vitamingabe möglicherweise auch als einfaches und gut verträgliches Therapeutikum bei anderen Patienten mit Unterhautproblemen zum Einsatz kommen, unabhängig davon, ob bei diesen die Glykosylierung betroffen ist oder nicht. Auch die zusätzliche Einnahme des gut verträglichen Vitamin B2, auch Riboflavin genannt, dessen Mangel ebenfalls mit Hauterkrankungen einhergeht und normalerweise den Zustand der Haut positiv beeinflusst, könnte als potentieller, leicht anzuwendender Therapieansatz bei dermalen Beschwerden angewandt werden [79, 80].

Auch die anfänglich erheblichen immunologischen Auffälligkeiten bei dem Patienten könnten in Verbindung zum Vitaminmangel stehen, da ein solcher die Entwicklung neutrophiler Granulozyten stören und den Level an inflammatorischen Zytokinen erhöhen kann. Reduzierte Mengen der Vitamine D, E und K werden zudem häufig bei Patienten mit respiratorischen Infekten und allgemeinen Beschwerden der Immunantwort beschrieben [75]. Unter Vitamingabe ergab sich auch hier eine positiv zu bewertende Entwicklung bei unserem Patienten, da bei den wiederholten Überprüfungen des Impfschutzes nunmehr zumindest ausreichende Werte erhalten wurden und seine allgemeine Infektionsneigung stark abnahm.

Im Vergleich von ATP6AP1-CDG mit den Defekten in Untereinheiten der V-Typ H<sup>+</sup>-ATPase, die ebenfalls zu einem Glykosylierungsphänotyp führten (ATP6V0A2, ATP6V1A, ATPV1E1, CCDC115 und TMEM199), stellt neben muskulärer Hypotonie und Leberproblemen vor allem das Cutis laxa Syndrom ein häufig übereinstimmendes Symptom dar. Patienten mit CCDC115- und TMEM199-CDG sind bislang nicht von Hautproblemen betroffen, zeigten aber vergleichbar mit ATP6AP1-CDG eine Hepatomegalie. Im Gegensatz zu ATP6AP1-CDG wurden bei den anderen Defekten der Protonenpumpe weiterhin unterschiedliche Ausprägungen

wie Gesichtsdysmorphien, Hüft dysplasien, Skoliose, Herzanomalien, Krampfanfälle und Auffälligkeiten in der Magnetresonanztomographie (MRI) beobachtet.

Ob bei Patienten mit mutierten  $H^+$ -ATPase Untereinheiten wie ATP6V0A3, ATP6V0A4 und ATP6V1B1 nicht eventuell ebenfalls ein CDG-Defekt vorliegt, lässt sich aus den entsprechenden Publikationen leider nicht entnehmen. Es ist fraglich, ob diese Patienten überhaupt in Richtung einer Glykosylierungsstörung untersucht worden sind. Aufgrund zahlreicher Übereinstimmungen mit für die Stoffwechselerkrankung CDG bekannten, klinischen Symptomen wie Osteoporose, wiederkehrende Infektionen, Knochenmarksversagen, Gesichtsdysmorphien, Hepatosplenomegalie, psychomotorische Retardierung, distale renale tubuläre Azidose oder Taubheit [45] würde eine nachträgliche Charakterisierung in Richtung CDG aber sicherlich Sinn machen.

## **6.2. Ein CDG-Typ II N-Glykosylierungsdefekt verursacht durch ATP6AP1-Defizienz**

Aufgrund des multiorganischen Phänotyps wurde der betroffene Patient zunächst zur Diagnose mit Hilfe der isoelektrischen Fokussierung (IEF) des Glykoproteins Serum-Transferrin auf einen N-Glykosylierungsdefekt hin getestet. Das Ergebnis war ein Typ II-Bandenmuster, charakteristisch hierfür sind erhöhte Werte des Tri-, Di-, Mono- und Asialotransferrins bei gleichzeitig reduziertem Tetrasialotransferrin (Abb.5.2.). Dieses CDG-II Muster wies auf einen Defekt auf Ebene der Prozessierung des Glykoproteins im Golgi-Apparat hin. Interessant war, dass die Besserung des klinischen Phänotyps (2008) ebenfalls mit einem weniger auffälligen Ergebnis in der erneut durchgeführten IEF mit einer aktuellen Serumprobe von 2017 des Patienten (Alter von 9,5 Jahren) einherging. Zwar war immer noch das spezifische Typ II-Bandenmuster des Transferrins zu erkennen, jedoch bewegten sich die quantifizierten Werte des Tetra- und Asialotransferrins in Richtung Referenzwerte. Ob das ATP6AP1-Protein vor allem in der frühen Entwicklung essentiell für die Funktionalität der V-Typ  $H^+$ -ATPase ist oder ob die Veränderung aufgrund von kompensatorischen Mechanismen anderer Proteine hervorgerufen wurde, kann ohne ein Tiermodell nicht beantwortet werden. Des Weiteren zeigten massenspektrometrische Analysen vor allem eine Erhöhung diantennärer Strukturen mit fehlenden N-Acetylglucosamin-, Galaktose- und Sialinsäureresten und eine allgemeine Reduktion komplexer, sialylierter Strukturen

(Abb.5.4.), was die Ergebnisse unserer IEF des Serum-Transferrins bestätigt. Diese Daten stehen zudem im Einklang mit Analysen der N-Glykane bei ATP6V1E1- und ATP6V1A-CDG, wo ebenfalls eine Reduktion komplexer, sialylierter Strukturen und ein Anstieg veränderter Glykanstrukturen mit Galaktoseverlust detektiert wurde [68]. Auch in Patienten mit Mutationen im *ATP6V0A2*-Gen fand sich ein vermindertes Vorkommen vollständig sialylierter Strukturen bei gleichzeitiger Reduktion triantennärer Strukturen ohne Sialinsäurereste und ein Anstieg von N-Glykanen ohne Galaktose [67].

Bei unserem ATP6AP1-CDG Patienten wurde zusätzlich die Verteilung der N-Glykane vom Komplex-, Hybrid-Typ und den mannosereichen Strukturen betrachtet, wobei eine Reduktion des Komplex-Typs und eine Verschiebung in Richtung mannosereicher Strukturen (ein Plus von ~ 90 %) und des Hybrid-Typs (ein Plus von ~ 80 %) zu erkennen war. Dies lässt annehmen, dass Glykoproteine im Golgi-Apparat auf diese alternativen N-Glykansynthesewege umgeleitet wurden. Insbesondere der bei der massenspektrometrischen Analyse der N-Glykane detektierte Anstieg von Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>, dem kleinsten mannosereichen Glykan im Golgi, lässt vermuten, dass dieser aufgrund eines Rückstaus auf Ebene der N-Acetylglucosaminyltransferase 1 (MGAT1) hervorgerufen wurde. Dieses Enzym überträgt normalerweise einen N-Acetylglucosaminrest (GlcNAc) auf das wachsende, mannosereiche, proteinverknüpfte Oligosaccharid („protein linked oligosaccharide“, PLO) im Golgi und kontrolliert zugleich auch die Synthese des Hybrid- und Komplex-Typs der N-Glykane [81]. Anders als beispielsweise bei MGAT2-, SLC35A2- oder auch SLC35C1-CDG lieferte hier das N-Glykanprofil lediglich einen generellen Hinweis auf eine Beteiligung von Zuckertransportern und Glykosyltransferasen des Golgi-Apparats und keinen spezifischen Anhaltspunkt auf die genaue molekulare Ursache des Defekts unseres Patienten.

Auch die im Nachfolgenden durchgeführten qRT-PCR Analysen N-glykosylierungsspezifischer Transporter und Enzyme des Golgi-Apparats ergaben zumeist reduzierte Werte ihrer mRNA-Expression (Abb.5.5.), was zwar erneut die Auswirkung auf die N-Glykanbiosynthese im Golgi-Apparat bestätigte, aber nicht zur Aufklärung des neuen CDG-Defekts beitrug. Aus diesem Grund haben wir uns für die Durchführung des „Whole Exome Sequencing“ (WES) bei unserem Patienten entschieden. Die hierbei neu identifizierte Punktmutation c.542T>G (p.L181R) des Patienten im *ATP6AP1*-Gen wurde über Sanger-Sequenzierung der cDNA und

nochmals im Exon 4 des Gens bestätigt (Abb.5.6.). Die Mutation betrifft eine hoch konservierte Aminosäure des Proteins, was auf eine essentielle Rolle dieser in Bezug auf die Proteinfunktionalität schließen lässt. Durch eine in der qRT-PCR detektierte, reduzierte mRNA-Expression von *ATP6AP1* konnte weiterhin nachgewiesen werden (Abb.5.10.), dass die im Western Blot um ca. 50 % signifikant reduzierte Proteinmenge des Patienten (Abb.5.7.) bereits auf eine damit einhergehende, reduzierte Menge an mRNA zurückzuführen war. Ob die Mutation zur Instabilität der mRNA führte oder ob bereits die *ATP6AP1*-mRNA-Expression betroffen war, wurde nicht weiter untersucht. Weiterhin zeigte sich der ATP6AP1-Proteinverlust auch in unseren Immunfluoreszenzaufnahmen (Abb.5.9.), bei denen eine deutlich reduzierte ATP6AP1-Signalstärke im Patienten im Vergleich zur Kontrolle erhalten wurde. In den Immunfluoreszenzuntersuchungen zur Lokalisation ergab sich eine weitreichende Verteilung von ATP6AP1 über die gesamte Zelle mit Ausnahme des Golgi-Apparats (Abb.5.8.), was vermutlich auf das Vorliegen von ATP6AP1 im Cytoplasma zurückzuführen ist. Weiterhin haben wir unter Verwendung von ERGIC-53 eine kontrollähnliche Kolokalisation des Proteins im Bereich des ER-Golgi-Intermediär-Kompartiments detektiert. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit Daten aus dem Modellorganismus *Xenopus laevis*, wo gezeigt werden konnte, dass ATP6AP1 vor allem im frühen sekretorischen Weg lokalisiert ist. Untersuchungen in humanen Hepatozyten ergaben zudem eine primäre Lokalisation des Proteins am ER sowie dem ER-Golgi-Intermediär-Kompartiment (ERGIC) und im Cytoplasma sowie in geringen Mengen am *cis*-Golgi [47, 50, 51]. Bei Verwendung von GM130 als Markerprotein ergab sich hingegen bei unserem Patienten und der Kontrolle keine Kolokalisation mit ATP6AP1. Dies führen wir allerdings eher auf unterschiedliche Expressionsraten des Proteins in den verschiedenen Zelltypen und nicht auf den Defekt zurück. Zusammenfassend scheint sich die *ATP6AP1*-Mutation vor allem auf die Proteinexpression jedoch nicht seine Lokalisation in Fibroblasten auszuwirken.

### **6.3. Weitreichender Effekt der *ATP6AP1*-Mutation auf den Metabolismus des Patienten**

#### **6.3.1. Defekte, peroxisomale $\beta$ -Oxidation verursacht metabolische Auffälligkeiten**

Während der Kultivierung der Patientenfibroblasten fiel ein deutlich verlangsamtes Zellwachstum im Vergleich zu Kontrollzelllinien auf, was sich anhand einer signifikant erhöhten Proliferationszeit und nachfolgend einem signifikant reduzierten Zellwachstum bestätigen ließ (Abb.5.11.).

Um den Grund hierfür zu bestimmen, wurden zunächst massenspektrometrische Untersuchungen der Aminosäuren in den Zellen sowie im Patientenserum durchgeführt (Abb.5.12.). Bei der Analyse in den Fibroblasten fiel eine zumeist generelle Reduktion von Aminosäuren im Vergleich zur Kontrolle auf. So wurden u.a. erniedrigte Werte für L-Prolin, L-Ornithin, L-Citrullin und L-Arginin gefunden wie sie auch bei Patienten mit Mutationen innerhalb des *ALDH18A1*-Gens zu finden sind. Hierbei handelt es sich um eine Erkrankung mit Pyrrolin-5-Carboxylat-Synthetase (P5CS)-Mangel, einem Schlüsselenzym in der Synthese von Prolin und Ornithin [82]. Interessanterweise überschneiden sich die klinischen Symptome dieser Patienten mit unserem *ATP6AP1*-Patienten bezüglich des Cutis laxa Syndroms, einer auftretende Mikrozephalie, Hypotonie und einer Wachstumsstörung. Jedoch findet man in *ALDH18A1*-Patienten zusätzlich eine mitochondriale Dysfunktion, die in den Fibroblasten unseres Patienten nicht nachgewiesen werden konnte (Abb.5.15.). Die Analysen im Serum ergaben mit Ausnahme von L-Asparagin und L-Glutamin zumeist erhöhte Werte bei den Aminosäuren. Ferner führen Glutamin- oder Asparagindefizien bei Betroffenen zu einer psychomotorischen Retardierung, was für den hier beschriebenen *ATP6AP1*-CDG Patienten ebenfalls im ersten halben Lebensjahr dokumentiert wurde. Eine Glutamindefizienz kann zudem in muskulärer Hypotonie resultieren, was auch bei unserem Patienten diagnostiziert worden ist [83]. Die unterschiedlichen Datensätze aus Serum und Fibroblasten stehen grundsätzlich nicht im Widerspruch, sondern sind vermutlich den unterschiedlichen Syntheseorten (Leber und Fibroblasten) geschuldet. Weiterhin können sie auch dadurch zustande kommen, dass die *ATP6AP1*-Mutation durch Beeinträchtigung der ionenabhängige Transportkanäle potentiell die Aufnahme oder auch Abgabe der Aminosäuren aus dem sowie in das Blut beeinflussen könnte [84]. Auch spielt der Zeitpunkt der

Blutabnahme eine Rolle, sodass Messwerte je nach vorangegangenen Nahrungsaufnahmen oder auch medikamentösen Therapien variieren können. Hinzu kommt, dass auch in Fibroblasten das Vorkommen verschiedener Aminosäuren je nach Zellzyklus oder vielleicht sogar Zellpassage abweichen kann. Zusammenfassend betrachtet ergab sich sowohl für das Serum als auch die Fibroblasten der Hinweis einer Entgleisung im Bereich des Aminosäurestoffwechsels. Da weiterhin ein verlangsamtes Zellwachstum auch bei erhöhter Autophagie, erhöhtem ER-Stress und auch verminderter  $\beta$ -Oxidation beobachtet wurde [85, 86], wurden in nachfolgenden Untersuchungen Western Blot-Analysen mit LC3 (Abb.5.13.), BiP (Abb.5.14.) sowie HiF1 $\alpha$  (Abb.5.15) durchgeführt. Bereits bei der Analyse von LC3 und BiP in Zellen, die unter Standardkulturbedingungen gehalten wurden, ergaben sich erhöhte Signalintensitäten beim Patienten im Vergleich zur Kontrolle, was auf eine vermehrte Autophagie bei gleichzeitig verminderter Stressresistenz schließen ließ. Durch Stressen der Zellen bei Änderung des pH-Werts des Zellkulturmediums von pH 7,2 auf pH 9,2 oder auf pH 5,2 zeigte sich bezüglich des Markers LC3 zudem eine noch weiter angestiegene Autophagierate, was mit einer fehlregulierten pH-Wert-Homöostase in den Patientenzellen in Verbindung stehen könnte. Dies sollte mit einer Färbung der Zellen mit dem pH-wertabhängigen Farbstoff Acridinorange und anschließender Durchflusszytometrie kontrolliert werden, das sich bei Anregung der gefärbten Zellen mit blauem Licht, bei zunehmend saurem pH-Wert, das normalerweise grün emittierte in orange emittiertes Licht ändert. Jedoch zeigten sich keine Auffälligkeiten, da diese Methode für die Patientenfibroblasten vielleicht nicht sensitiv genug war.

Bei der Überprüfung der mitochondrialen  $\beta$ -Oxidation mit HiF1 $\alpha$  ergaben sich hingegen kontrollähnliche Werte für unseren Patienten. Diesbezüglich durchgeführte Untersuchungen von Jansen et al. 2016 [47] ergaben hier jedoch Auffälligkeiten. Allerdings wurden deren Analysen in Hepatozyten durchgeführt, wodurch sich die Ergebnisse aufgrund einer abweichenden, gewebespezifischen Expression und Funktion von ATP6AP1 unterscheiden können. Im weiteren Verlauf unserer Untersuchungen wurde auch die peroxisomale  $\beta$ -Oxidation im Western Blot mit Hilfe von ACOX3 als Marker überprüft (Abb.5.16.). Dieses Protein ist hier an der Desaturierung von Acyl-CoA aktivierten Fettsäuren in Peroxisomen beteiligt [87] und zeigte beim Patienten ein signifikant reduziertes Signal. Weiterhin konnte eine verminderte Katalaseaktivität nachgewiesen werden (Abb.5.17.). Da dieses Enzym

normalerweise das bei der  $\beta$ -Oxidation entstehende, giftige Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff umsetzt, könnte der Aktivitätsverlust zu einem Anstieg von Wasserstoffperoxid in den Patientenzellen geführt haben, wodurch es nachfolgend zur Beeinflussung biochemischer Vorgänge in den Peroxisomen gekommen sein könnte. In diesem Zusammenhang ist erwähnenswert, dass die Katalaseaktivität in Leber- und Nierenzellen eisendefizienter Ratten sowohl vom pH-Wert als auch vom Einbau von Kupferionen im aktiven Zentrum des Enzyms abhängig ist [88 – 90]. Daraus ergibt sich auch ein potentieller Zusammenhang des verminderten Kupferspiegels im Blut des ATP6AP1-CDG Patienten und dessen verminderter Katalaseaktivität.

Im Allgemeinen dient die  $\beta$ -Oxidation in den Peroxisomen dem Abbau verzweigter, langkettiger Fettsäuren. Die dabei entstehenden, verkürzten Fettsäuren werden anschließend in den Mitochondrien weiter oxidiert und versorgen damit den menschlichen Körper kontinuierlich mit Energie. Für den Transfer der Fettsäuren aus den Peroxisomen in die Mitochondrien ist L-Carnitin notwendig [91, 92], was zusammen mit der aktivierten Fettsäure (Acyl-CoA) zur Transportform Acylcarnitin in den Peroxisomen konvertiert wird [93]. Zur näheren Analyse der peroxisomalen  $\beta$ -Oxidation wurden die Acylcarnitine aus dem Patientenzelllysats und -serum sowie entsprechenden Kontrollproben massenspektrometrisch analysiert (Abb.5.18.). Es fanden sich im Falle des Patienten primär erhöhte Werte neben einigen wenigen, kontrollähnlichen Ergebnissen, was die grundsätzliche Beteiligung der peroxisomalen  $\beta$ -Oxidation an der Erkrankung des Patienten weiter belegte. Besonders hervorzuheben sind hierbei die Ergebnisse aus den Fibroblasten, die eine Akkumulation von mittel- bis langkettigen bei gleichzeitiger Reduktion von kurzkettigen Acylcarnitinen zeigten. Verantwortlich hierfür könnte ein möglicherweise beeinträchtigter pH- und ionenabhängiger Transport des Carnitins in die Peroxisomen sein [91, 92], bedingt durch ein fehlreguliertes pH-Wert-Gleichgewicht in den Patientenfibroblasten. Weiterhin lässt sich ein Defekt des Exports aus den Peroxisomen oder des Imports in die Mitochondrien der an Carnitin gebundenen Fettsäuren vermuten, was die Reduktion kurzkettiger und Anreicherung mittel- bis langkettiger Acylcarnitine in den Fibroblasten erklären würde. Unterschiede in den Ergebnissen von Serum- und Fibroblastenproben lassen sich vergleichbar mit den o.g. Untersuchungen zu den Aminosäuren begründen.

Dass der Defekt bei unserem Patienten vor allem auf Höhe der Peroxisomen verursacht wird, zeigten weiterhin auch die signifikant erhöhten Messwerte der besonders langkettigen, verzweigten und gesättigten Fettsäuren, der Phytan- und der Pristansäure (Abb.5.19.). Da diese nur in Peroxisomen abgebaut werden können [94], belegte ihr Anstieg eine erheblich beeinträchtigte, peroxisomale  $\beta$ -Oxidation wie sie beispielsweise auch bei der D-bifunktionalen Protein (DBP)-Defizienz oder dem Zellweger Syndrom vorliegt. Ähnlich wie bei unserem ATP6AP1-Patienten zeigen die so Betroffenen auch Symptome wie eine hohe Stirn, Mikrozephalie, muskulärer Hypotonie und Hepatosplenomegalie [95, 96].

### **6.3.2. Veränderte Lipidhomöostase in Patientenfibroblasten**

Aufgrund der verminderten Zellproliferation in Verbindung mit dem gestörten Acylcarnitinhaushalt wurden die Patientenfibroblasten auch auf Lipidanomalien hin untersucht. Lipide sind ubiquitär in den Zellen verteilt und dienen hier neben ihrer vielfältigen Beteiligung an Signalwegen und dem Zellaufbau u.a. als Membranlipide, oder auch als wichtige Energielieferanten beispielsweise in Form von Lipidtröpfchen, ein Reservoir und Speicher von Triglyceriden und Cholesterinestern [97, 98]. Da eine veränderte Lipidhomöostase ebenfalls das verminderte Wachstum der Patientenzellen erklären würde, wurden die Zellen mit dem Farbstoff Oil-Red O untersucht, wobei eine signifikante Akkumulation von Lipidtröpfchen in den Patientenfibroblasten (Abb.5.20.) wie auch in den untersuchten Hepatozyten der publizierten ATP6AP1-CDG Patienten gefunden wurde [47].

Bei Morbus Wilson kommt es aufgrund eines Defekts im kupfertransportierenden Enzym P-Typ-ATPase (ATP7B) zu einer verminderten Ausschleusung von Kupfer aus den Leberzellen und nachfolgend zu einem verminderten Einbau von Kupfer in Coeruloplasmin. Ähnlich wie bei unserem Patienten zeigen sich hier klinisch ebenfalls Leberprobleme in Verbindung mit Auffälligkeiten im Lipidstoffwechsel [99, 100] wie beispielsweise veränderte Cholesterolvere. Zur Überprüfung, ob sich die Anhäufung von Lipidtröpfchen in unseren Patientenfibroblasten durch Erhöhung der Kupferkonzentration ändern würde, wurden die Zellen mit  $\text{Cu}_2\text{SO}_4$  belastet und die Oil-Red O Färbung wiederholt. Es zeigte sich hierbei eine noch signifikantere Akkumulation von Lipidtröpfchen in den Patientenzellen im Vergleich zur Kontrolle, sodass zwar keine Besserung aber dennoch ein Zusammenhang zwischen Kupferionenkonzentration und Lipidhomöostase hergestellt werden kann.



Im weiteren Schritt erfolgte eine massenspektrometrisch Detailanalyse der Lipide aus Fibroblasten des Patienten und der Kontrollen (Abb.5.21.). Es wurden hierbei signifikante Reduktionen von Phosphatidylcholin (PC), -ethanolamin (PE) sowie Hexosylceramid (HexCer) detektiert. Bei Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin handelt es sich um Phospholipide, die u.a. für die Zusammensetzung der Zellmembran essentiell sind. Da zudem Hexosylceramid ein über die Sphingolipidsynthese daran beteiligtes Molekül darstellt [101], kann ein genereller Einfluss auf grundlegende Bestandteile der Zellmembran im Zuge der ATP6AP1-Defizienz bei unserem Patienten angenommen werden. Hierdurch könnten nachfolgend auch membranständige Transporter für Aminosäuren ( $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ ) oder Acylcarnitine aus den Peroxisomen und auch in die Mitochondrien (Carnitin-Acylcarnitin-Translokase, CATC) in ihrer Funktion eingeschränkt sein [102, 103]. Weiterhin könnte eine veränderte Membranzusammensetzung den vesikulären Transport beeinträchtigen. Diese potentiellen Defekte würden eine weitere Erklärung für die Fehlregulation des Aminosäure- und Acylarnitinhaushalts liefern. In Fibroblasten von Patienten mit ATPV0A2-CDG wurde beispielsweise auch ein verlangsamter, retrograder Transport zwischen Golgi und ER nachgewiesen [67], was jedoch nicht in Zusammenhang mit Membranlipiden gebracht wurde.

Phosphatidylcholin stellt die Hauptkomponente von Phospholipidmonolayern dar, die beispielsweise Lipidtröpfchen und auch „Very Low Density“ Lipoproteine (VLDL) umgeben [104]. Durch seine Abnahme und einen damit verminderten Export dieser Lipidspeicher kann es so zu deren Anhäufung in den Zellen kommen. Ein Effekt, den wir auch anhand der Akkumulation der Lipidtröpfchen in den Fibroblastenzellen unseres Patienten beobachtet haben, sowie auch in den Hepatozyten der schon bekannten ATP6AP1-CDG Patienten beobachtet wurde [47]. Das Hauptsyntheseorgan für alle Proteine bei Mensch und Tier ist die Leber, sodass von dort aus die VLDL-bildenden Lipoproteine Triacylglyceride, Phospholipide und Cholesterol zu anderen Geweben transportieren. Weiterhin führt die reduzierte Ausschleusung der VLDL hier oftmals zu einer Fettleber und nachfolgend zur Hepatomegalie. Diese Beobachtung geht bereits auf Untersuchungen an Hunden und Katzen in den 1930er Jahren zurück [105, 106], was dann in den 1990er Jahren an Mäusen und auch anhand von Patienten bestätigt werden konnte [107]. In diesem Zusammenhang ist zudem erwähnenswert, dass Li et al. 2006 [108] vermuteten, dass das Verhältnis von Phosphatidylcholin zu Phosphatidylethanolamin einen

entscheidenden Einfluss auf den Membranaufbau der Hepatozyten hat. Da jedoch von unserem ATP6AP1-CDG-Patienten bislang keine Leberbiopsie für detaillierte Untersuchungen entnommen wurde, können wir den Zusammenhang zwischen möglicherweise gestörtem Lipidproteinexport und Hepatozytenmembranaufbau einerseits und der Leberauffälligkeit andererseits nur vermuten.

Phosphatidylethanolamin wiederum wird für Membranfusionen und den Abbau des kontraktilen Rings während der Zytokinese in der Zellteilung benötigt [109]. Zusätzlich wird vermutet, dass es für die Wölbungen von Membranen notwendig ist [110]. Hiermit ergibt sich eine weitere mögliche Verbindung zum verlangsamten Wachstum der Patientenzellen.

Weiterhin zeigten sich in der Lipidanalyse erhöhte Werte für Cholesterol, Ceramid und Phosphatidylglycerol. Cholesterol zählt zu den Fetten, ist aber eigentlich ein Isoprenoid. Es stellt einen essentiellen Bestandteil der Plasmamembran dar, da es mit für die Stabilität der Membranen verantwortlich ist, beteiligt sich jedoch auch am Zellsignaling [111]. So könnte sich eine Anreicherung des Cholesterols folglich auch auf die Membranfluidität bei unserem Patienten ausgewirkt haben. Cholesterol wird durch den Polyisoprenoid-Stoffwechselweg ausgehend von Mevalonat über Farnesyl-Pyrophosphat und Squalen bereitgestellt. Im selben Reaktionsprozess werden auch Ubichinon (Coenzym Q) sowie das für die initialen Schritte der N-Glykosylierung benötigte Dolichol synthetisiert [112]. Inwieweit sich die durch Massenspektrometrie sowie qRT-PCR bestätigte, verminderte N-Glykanbiosynthese auch auf den Polyisoprenoidweg durch ein Herabsenken der Syntheserate von Dolichol bei gleichzeitiger Erhöhung der Ubichinon- und Cholesterolherstellung auswirkt, wurde von uns nicht untersucht, wäre aber ein spannender Forschungsansatz.

Ceramide zählen zu den Sphingolipiden und kommen u.a. in der Hornschicht des Menschen vor. Hier schützen sie die Haut vor Austrocknung und vor dem Eindringen von Fremdstoffen. Daneben beteiligt sich Ceramide auch an der Zelldifferenzierung sowie der Signaltransduktion [113, 114]. Ob sich die verminderte Menge an Ceramiden mit dem Cutis laxa Phänotyp unseres Patienten in Einklang bringen lässt, bleibt fraglich. Ein wahrscheinlicherer Effekt ergibt sich hingegen wiederum im Hinblick auf das verminderte Wachstum der Patientenfibroblasten.

Interessant ist weiterhin, dass Phosphatidylglycerol an der Lungenreifung während der Embryonalentwicklung teilnimmt und später auf Oberflächen von Alveolaren zu

finden ist, wo es zur Funktionalität und dem Schutz der Lunge beiträgt [115]. Die erhöhte Infektionslage des Patienten könnte demnach auch durch eine reduzierte Menge an Phosphatidylglycerol mit verursacht worden sein.

Die ebenfalls untersuchten Plasmalogene gehören zur Gruppe der Etherphospholipid, die sich strukturell von den Phosphatidylcholinen beziehungsweise Phosphatidylethanolaminen und seltener von den Phosphatidylserinen ableiten [116, 117]. Sie machen 15 – 20 % der Phospholipide in Zellmembranen aus und treten gehäuft zu bis zu 50 % in Gehirn, Herz, Niere, Lunge und der Skelettmuskulatur auf, jedoch in nur sehr geringen Mengen in der Leber. Die Plasmalogenbiosynthese beginnt in den Peroxisomen und wird im ER weitergeführt. Ihre Funktion beschränkt sich nicht nur auf die Membranfluidität und –fusion, sondern es wird auch vermutet, dass sie sich an der Zelldifferenzierung und zellulären Signalwegen beteiligen sowie als Antioxidant fungieren [117].

Die Analyse der Patientenplasmalogene 16:0 und 18:0 zeigten einen signifikanten Anstieg der 18:1 (P-Petroselinensäure)-, 20:4 (P-Arachidonsäure)- und 22:4 (P-Docosadiensäure)-Spezies, wohingegen Reduktionen der 22:5 (P-Clupanodonsäure)- und 22:6 (P-Cervonsäure)-Spezies im Vergleich zur Kontrolle detektiert wurden (Abb.5.21.B). Diese Fehlregulation der Plasmalogene weist nochmals auf einen Defekt in den Peroxisomen der Patientenzellen hin und könnte durch seine Beeinflussung der Signalwege innerhalb der Zelle sowie durch eine verringerte, antioxidative Aktivität zum verlangsamten Zellwachstum der Fibroblasten beigetragen haben.

Zusammenfassend demonstrierte die Lipidomikanalyse generelle Deregulationen verschiedenster Lipidspezies in den Patientenzellen, die in ihrer Gesamtheit vermutlich zum Patientenphänotyp beigetragen haben. Jedoch müssen diese Ergebnisse kritisch betrachtet werden, da die Analysen nur in den uns zur Verfügung stehenden Fibroblasten durchgeführt werden konnten. Spezifischere Ergebnisse wären möglicherweise in geeigneterem Probenmaterial wie einer Leberbiopsie oder sogar kultivierte Hepatozyten zu erzielen gewesen.

## 6.4. Ausblick

Insgesamt führt die in unserem Patienten neu identifizierte Mutation des *ATP6AP1*-Gens (c.542T>G) zu einem N-Glykosylierungsdefekt des CDG-Typ II bei reduzierter

Expression des entsprechenden Proteins, verringertem Zellwachstum und einer generellen Fehlregulation des Aminosäuren-, Acylcarnitin- und Lipidstoffwechsels, welche möglicherweise zum Patientenphänotyp beigetragen haben. Dennoch bleibt der genaue Effekt auf die Funktion der  $H^+$ -ATPase, aber auch die N-Glykoproteinbiosynthese, zelluläre Prozesse und damit auch der krankheitsauslösende Mechanismus der Mutation unklar.

Da unser Patient unter anderem das Cutis laxa Syndrom und einen entarteten Acylcarnitinhaushalt zeigt, könnte als potentieller Therapieansatz Riboflavin, Vitamin B2, in Supplementationsversuchen mit dessen Fibroblasten getestet werden. Einerseits schützt es die Haut und andererseits zeigte dieser Cofaktor auch schon in Patienten mit MADD, einer Stoffwechselerkrankung des Fettsäure- und Proteinmetabolismus, eine Besserung ihres entarteten Acylcarnitinhaushalts.

Auf Ebene der  $\beta$ -Oxidation konnten wir bislang nur einen Defekt in den Peroxisomen und nicht den Mitochondrien nachweisen. Um dennoch dem Verdacht eines beeinträchtigten Energiestoffwechsels, aufgrund der veränderten Acylcarnitinwerte und auch des defizienten Lipidhaushalts weiter nachzugehen, wäre es interessant, enzymatische Aktivitätsassays zu den Komplexen der Atmungskette durchzuführen. Dies vor allem deshalb, da  $FADH_2$  und  $NADH+H^+$  aus der  $\beta$ -Oxidation über die mitochondriale Atmungskette ATP liefern. Zwar wurde bei einer Acridinorangegefärbung mit anschließender Durchflusszytometrie keine potentiell misregulierte pH-Homöostase festgestellt, jedoch könnten diesbezüglich sensitivere Untersuchungen, wie über die Verteilung radioaktiv markierter Benzoesäure, in den Patientenfibroblasten erfolgen.

Weiterhin ergaben die Lipidanalysen einen Anstieg des Cholesterols in den Patientenzellen. Wegen des diagnostizierten N-Glykosylierungsdefekts und da die Cholesterol- sowie Dolicholsynthese im gleichen Stoffwechselprozess, dem Polyisoprenoid-Syntheseweg erfolgen, könnte auch dieser biochemisch überprüft werden.

Jedoch sollte man zusätzlich berücksichtigen, dass sich der Einfluss der *ATP6AP1*-Mutation in Organen wie der Leber mit einer hohen Glykoproteinbiosyntheserate und je nach Organ durch eine abweichende, gewebespezifische Expressionsrate unterscheiden könnte. Zum weiteren Verständnis der Pathophysiologie wäre es notwendig, nicht nur humane Fibroblasten als Modellsystem zu betrachten, sondern

die Untersuchungen auch auf beispielsweise Hepatozyten oder ein Tiermodell auszuweiten.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Dell, A., Galadari, A., Sastre, F. and Hitchen, P. *Similarities and differences in the glycosylation mechanisms in prokaryotes and eukaryotes*. Int J Microbiol, 2010. 148178.
2. Robert, G.S. *Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds*. Glycobiology, 2002. **12**(4):43R-56R.
3. Kelley, W.M, Michael, T. and Alison V.N. *Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2012. **13**(7):448-62.
4. Sairam, M.R. and Faseb, J. *Role of carbohydrates in glycoprotein hormone signal transduction*. 1989 **3**(8):1915-26.
5. Jamey, D.M. and Prabhjit, K.G. Mammalian glycosylation in immunity. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(11):874–887
6. Varki, A., Cummings, R.D., Esko, J.D., Freeze, H.H., Stanley, P., Bertozzi, C.R., Hart, G.W. and Etzler, M.E. *Essentials of Glycobiology, 2nd edition*. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009.
7. Helenius, A. and Aebi, M. *Intracellular functions of N-linked glycans*. Science, 2001. **291**(5512):2364-9.
8. Schwarz, F. and Aebi, M. *Mechanisms and principles of N-linked protein glycosylation*. Curr Opin Struct Biol, 2011. **21**(5):576-82.
9. Shrimall, S., Cherepanova, N.A. and Gilmore, R. *Cotranslational and posttranslational N-glycosylation of proteins in the endoplasmic reticulum*. Semin Cell Dev Biol, 2015. **41**: 71-8.
10. Aebi, M. *N-linked protein glycosylation in the ER*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1833**(11):2430-7.
11. Lannoo, N. and Van Damme, E.J. *N-glycans: The making of a varied toolbox*. Plant Sci, 2015. **239**: 67-83.
12. Julio, J.C. and Armando, J.P. *A sweet code for glycoprotein folding*. FEBS Lett, 2015. **589**(22): 3379-87.
13. Ryman, D., Pianne, R., Millón, M.B., Race, V., Sturiale, L., Garozzo, D., Mills, P., Clayton, P., Asteggiano, C.G., Quelhas, D., Cansu, A., Martins, E., Nassogne, M.C., Gonçalves-Rocha, M., Topaloglu, H., Jaeken, J., Foulquier, F. and Matthijs

- G. *MAN1B1* deficiency: an unexpected CDG-II. PLoS Genet, 2013. **9**(12):1003989.
14. Jensen, P.H., Kolarich, D. and Packer, N.H. *Mucin-type O-glycosylation--putting the pieces together*. FEBS J, 2009. **277**(1):81-94.
15. Hanisch, F.G. *O-glycosylation of the mucin type*. Biol Chem, 2001. **382**(2):143-9.
16. Ruan, H.B., Singh, J.P., Li, M.D., Wu, J. and Yang, X. *Cracking the O-GlcNAc code in metabolism*. Trends Endocrinol Metab, 2013. **24**(6):301-9.
17. Hurtado-Guerrero, R., Dorfmueller, H.C. and van Aalten D.M. *Molecular mechanisms of O-GlcNAcylation*. Curr Opin Struct Biol, 2008. **18**(5):551-7.
18. Eklund, E.A. and Freeze, H.H. *The congenital disorders of glycosylation: a multifaceted group of syndromes*. NeuroRx, 2006. **3**(2):54-63.
19. Jaeken, J. and Matthijs, G. *Congenital disorders of glycosylation: a rapidly expanding disease family*. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2007. **8**:261-78.
20. Jaeken, J. *Congenital disorders of glycosylation*. Ann N Y Acad Sci, 2010. **1214**:190-8.
21. Niehues, R., Hasilik, M., Alton, G., Körner, C., Schiebe-Sukumar, M., Koch, H.G., Zimmer, K.P., Wu, R., Harms, E., Reiter, K., von Figura K., Freeze, H.H., Harms, H.K. and Marquardt, T. *Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type 1b: phosphomannose isomerase deficiency and mannose therapy*. J Clin Invest, 1998. **101**(7):1414–1420.
22. Sparks, S.E. and Krasnewich D.M. *Congenital Disorders of N-Linked Glycosylation and Multiple Pathway Overview*. GeneReviews® [Internet], 2005.
23. Goreta, S.S., Dabelic, S. and Dumic, J. *Insights into complexity of congenital disorders of glycosylation.*, 2012. **22**(2):156-70.
24. Thiel, C., Meßner-Schmitt, D., Hoffmann, G.F. and Körner, C. *Screening for congenital disorders of glycosylation in the first weeks of life*. J Inherit Metab Dis, 2013. **36**(5):887-92.
25. Wopereis, S., Grünwald, S., Morava, E., Penzien, J.M., Briones, P., García-Silva, M.T., Demacker, P.N., Huijben, K.M. and Wevers, R.A. *Apolipoprotein C-III isofocusing in the diagnosis of genetic defects in O-glycan biosynthesis*. Clin Chem, 2003. **49**(11):1839-45
26. Jaeken, J., Vanderschueren-Lodewyckx, M., Casaer, P., Snoeck, L., Corbeel, L., Eggermont, E. and Eeckels, R. *Familial psychomotor retardation with markedly*

- fluctuating serum prolactin, FSH and GH levels, partial TBG deficiency, increased serum arylsulphatase A and increased CSF protein: a new syndrome?* *Pediatr Res*, 1980. **14**:179.
27. Jaeken, J. *Congenital disorders of glycosylation (CDG): it's (nearly) all in it!* *J Inherit Metab Dis*, 2011. **34**(4):853-8.
28. Scott, K, Gadomski, T., Kozicz, T. and Morava, E. *Congenital disorders of glycosylation: new defects and still counting.* *J Inherit Metab Dis*, 2014. **37**(4):609-17.
29. Jaeken, J., Hennet, T., Matthijs, G. and Freeze, H.H. *CDG nomenclature: time for a change!* *Biochim Biophys Acta*, 2009. **1792**(9):825-6.
30. Harms, H.K., Zimmer, K.P., Kurnik, K., Bertele-Harms, R.M., Weidinger, S. and Reiter, K. *Oral mannose therapy persistently corrects the severe clinical symptoms and biochemical abnormalities of phosphomannose isomerase deficiency.* *Acta Paediatr*, 2002. **91**(10):1065-72.
31. Mention, K., Lacaille, F., Valayannopoulos, V., Romano, S., Kuster, A., Cretz, M., Zaidan, H., Galmiche, L., Jaubert, F., de Keyzer, Y., Seta, N. and de Lonlay, P. *Development of liver disease despite mannose treatment in two patients with CDG-Ib.* *Mol Genet Metab*, 2008. **93**(1):40-3.
32. Morava, E. *Galactose supplementation in phosphoglucomutase-1 deficiency; review and outlook for a novel treatable CDG.* *Mol Genet Metab*, 2014. **112**(4):275-9.
33. Schrapers, E., Tegtmeyer, L.C., Simic-Schleicher, G., Debus, V., Reunert, J., Balbach, S., Klingel, K., Du Chesne, I., Seelhöfer, A., Fobker, M., Marquardt, T. and Rust, S. *News on Clinical Details and Treatment in PGM1-CDG.* *JIMD Rep*, 2016. **26**:77-84.
34. Marquardt, T., Lühn, K., Srikrishna, G., Freeze, H.H., Harms, E. and Vestweber, D. *Correction of leukocyte adhesion deficiency type II with oral fucose.* *Blood*, 1999. **94**(12):3976-85.
35. Dörre, K., Olczak, M., Wada, Y., Sosicka, P., Grüneberg, M., Reunert, J., Kurlemann, G., Fiedler, B., Biskup, S., Hörtnagel, K., Rust, S. and Marquardt, T. *A new case of UDP-galactose transporter deficiency(SLC35A2-CDG): molecular basis, clinical phenotype, and therapeutic approach.* *J Inherit Metab Dis*, 2015. **38**(5):931-40.



36. Madhus, I.H. *Regulation of intracellular pH in eukaryotic cells*. Biochem J, 1988. **250**(1):1-8.
37. Ilundáin, A. *Intracellular pH regulation in intestinal and renal epithelial cells*. Comp Biochem Physiol Comp Physiol, 1992. **101**(3):413-24.
38. Marshansky, V., Rubinstein, J.L. and Grüber, G. *Eukaryotic V-ATPase: novel structural findings and functional insights*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1837**(6):857-79.
39. Finbow, M.E. and Harrison, M.A. *The vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase: a universal proton pump of eukaryotes*. Biochem J, 1997. **324**(3):697-712.
40. Cotter, K., Stransky, L., McGuire, C. and Forgac, M. *Recent Insights into the Structure, Regulation, and Function of the V-ATPases*. Trends Biochem Sci, 2015. **40**(10):611-22.
41. Qi, J., Wang, Y. and Forgac, M. *The vacuolar (H<sup>+</sup>)-ATPase: subunit arrangement and in vivo regulation*. J Bioenerg Biomembr, 2007. **39**(5-6):423-6.
42. Nelson, H. and Nelson, N. *Disruption of genes encoding subunits of yeast vacuolar H<sup>(+)</sup>-ATPase causes conditional lethality*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(9):3503-7.
43. Lee B.S. *Regulation of V-ATPase expression in mammalian cells*. Curr Protein Pept Sci, 2012. **13**(2):107-16.
44. Jaeken, J. and Péanne, R. *What is new in CDG?* J Inherit Metab Dis, 2017. **40**(4):569-586.
45. Borthwick, K.J. and Karet, F.E. *Inherited disorders of the H<sup>+</sup>-ATPase*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2002. **11**(5):563-8.
46. Guillard, M., Dimopoulou, A., Fischer, B., Morava, E., Lefeber, D.J., Kornak, U. and Wevers, R.A. *Vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase meets glycosylation in patients with cutis laxa*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1792**(9):903-14.
47. Jansen, E.J., Timal, S., Ryan, M., Ashikov, A., van Scherpenzeel, M., Graham, L.A., Mandel, H., Hoischen, A., Iancu, T.C., Raymond, K., Steenbergen, G., Gilissen, C., Huijben, K., van Bakel, N.H., Maeda, Y., Rodenburg, R.J., Adamowicz, M., Crushell, E., Koenen, H., Adams, D., Vodopietz, J., Greber-Platzer, S., Müller, T., Dueckers, G., Morava, E., Sykut-Cegielska, J., Martens, G.J., Wevers, R.A., Niehues, T., Huynen, M.A., Veltman, J., Stevens, T.H. and Lefeber, D.J. *ATP6AP1 deficiency causes an immunodeficiency with*

- hepatopathy, cognitive impairment and abnormal protein glycosylation. Nat Commun*, 2016. **7**:11600.
48. Feng, H., Cheng, T., Pavlos, N.J., Yip, K.H., Carrello, A., Seeber, R., Eidne, K., Zheng, M.H. and Xu, J. *Cytoplasmic terminus of vacuolar type proton pump accessory subunit Ac45 is required for proper interaction with V(0) domain subunits and efficient osteoclastic bone resorption. J Biol Chem*, 2008. **283**(19):13194-204.
49. Muench, S.P., Huss, M., Song, C.F., Phillips, C., Wieczorek, H., Trinick, J. and Harrison, M.A. *Versatile roles of V-ATPases accessory subunit Ac45 in osteoclast formation and function. PLoS One*, 2011. **6**(11):e27155.
50. Jansen, E.J., Scheenen, W.J., Hafmans, T.G. and Martens, G.J. Accessory subunit Ac45 controls the V-ATPase in the regulated secretory pathway. *Biochim Biophys Acta*, 2008. **1783**(12):2301-10.
51. Schoonderwoert, V.T., Jansen, E.J. and Martens, G.J. *The fate of newly synthesized V-ATPase accessory subunit Ac45 in the secretory pathway. Eur J Biochem*, 2002. **269**(7):1844-53.
52. Yang, D.Q., Feng, S., Chen, W., Zhao, H., Paulson, C. and Li, Y.P. *V-ATPase subunit ATP6AP1 (Ac45) regulates osteoclast differentiation, extracellular acidification, lysosomal trafficking, and protease exocytosis in osteoclast-mediated bone resorption. J Bone Miner Res*, 2012. **27**(8):1695-707.
53. Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, 1989.
54. Ng, P.C. and Henikoff, S. *SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. Nucleic Acids Res*, 2003. **31**(13):3812-4.
55. Adzhubei, I.A., Schmidt, S., Peshkin, L., Ramensky, V.E., Gerasimova, A., Bork, P., Kondrashov, A.S. and Sunyaev, S.R. *A method and server for predicting damaging missense mutations. Nat Methods*, 2010. **7**(4):248-9.
56. Chun, S. and Fay, J.C. *Identification of deleterious mutations within three human genomes. Genome Res*, 2009. **19**(9):1553-61.
57. Schwarz, J.M., Rodelsperger, C., Schuelke, M. and Seelow, D. *MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. Nat Methods*, 2010. **7**(8):575-6.
58. Reva, B., Antipin, Y. and Sander, C. *Predicting the functional impact of protein mutations: application to cancer genomics. Nucleic Acids Res*, 2011. **39**(17):e118.

59. Shihab, H.A., Gough, J., Cooper, D.N., Stenson, P.D., Edwards, K.J., Day, I.N.M. and Gaunt, T.R. *Predicting the functional, molecular, and phenotypic consequences of amino acid substitutions using hidden Markov models*. Hum Mutat, 2013. **34**(1):57-65.
60. Choi, Y., Sims, G.E., Murphy, S., Miller, J.R. and Chan, A.P. *Predicting the functional effect of amino acid substitutions and indels*. PLoS One, 2012. **7**(10):e46688.
61. Liu, X., Jian, X. and Boerwinkle, E. *dbNSFP v2.0: a database of human non-synonymous SNVs and their functional predictions and annotations*. Hum. Mutat, 2013. **34**(9):2393-402.
62. Kircher, M., Witten, D.M., Jain, P., O'Roak, B.J., Cooper, G.M. and Shendure, J. *A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants*. Nat. Genet, 2014. **46**(3):310-5.
63. Thomé, M.P., Filippi-Chiela, E.C., Villodre, E.S., Migliavaca, C.B., Onzi, G.R., Felipe, K.B. and Lenz, G. *Ratiometric analysis of Acridine Orange staining in the study of acidic organelles and autophagy*. J Cell Sci, 2016. **129**(24):4622-4632.
64. Ruhaak, L.R., Huhn, C., Waterreus, W.J., de Boer, A.R., Neusüss, C., Hokke, C.H., Deelder, A.M. and Wuhler, M. *Hydrophilic interaction chromatography-based high-throughput sample preparation method for N-glycan analysis from total human plasma glycoproteins*. Anal Chem, 2008. **80**(15):6119-26.
65. Reiding, K.R., Blank, D., Kuijper, D.M., Deelder, A.M. and Wuhler, M. *High-throughput profiling of protein N-glycosylation by MALDI-TOF-MS employing linkage-specific sialic acid esterification*. Anal Chem, 2014. **86**(12):5784-93.
66. Okun, J.G., Conway, S., Schmidt, K.V., Schumacher, J., Wang, X., de Guia, R., Zota, A., Klement, J., Seibert, O., Peters, A., Maida, A., Herzig, S. and Rose, A.J. *Molecular regulation of urea cycle function by the liver glucocorticoid receptor*. Mol Meta, 2015. **4**(10):732-40.
67. Özbalci, C., Sachsenheimer, T. and Brügger, B. *Quantitative analysis of cellular lipids by nano-electrospray ionization mass spectrometry*. Methods Mol Biol, 2013. **1033**:3-20.
68. Kornak, U., Reynders, E., Dimopoulou, A., van Reeuwijk, J., Fischer, B., Rajab, A., Budde, B., Nürnberg, P., Foulquier, F., Lefeber, D., Urban, Z., Gruenewald, S., Annaert, W., Brunner, H.G., van Bokhoven, H., Wevers, R., Morava,

- E., Matthijs, G., Van Maldergem, L. and Mundlos, S. *Impaired glycosylation and cutis laxa caused by mutations in the vesicular H<sup>+</sup>-ATPase subunit ATP6V0A2*. Nat Genet, 2008. **40**(1):32-4.
69. Van Damme, T., Gardeitchik, T., Mohamed, M., Guerrero-Castillo, S., Freisinger, P., Guillemyn, B., Kariminejad, A., Dalloyaux, D., van Kraaij, S., Lefeber, D.J., Syx, D., Steyaert, W., De Rycke, R., Hoischen, A., Kamsteeg, E.J., Wong, S.Y., van Scherpenzeel, M., Jamali, P., Brandt, U., Nijtmans, L., Korenke, G.C., Chung, B.H.Y., Mak, C.C.Y., Hausser, I., Kornak, U., Fischer-Zirnsak, B., Strom, T.M., Meitinger, T., Alanay, Y., Utine, G.E., Leung, P.K.C., Ghaderi-Sohi, S., Coucke, P., Symoens, S., De Paepe, A., Thiel, C., Haack, T.B., Malfait, F., Morava, E., Callewaert, B. and Wevers, R.A. *Mutations in ATP6V1E1 or ATP6V1A Cause Autosomal-Recessive Cutis Laxa*. Am J Hum Genet, 2017. **100**(2):216-227.
70. Hellman, N.E. and Gitlin, J.D. *Ceruloplasmin metabolism and function*. Annu Rev Nutr, 2002. **22**:439-58.
71. Uriu-Adams, J.Y. and Keen, C.L. *Copper, oxidative stress and human health*. Mol Aspects Med, 2005. **26**(4-5):268-98.
72. Kaplan, J.H. and Maryon, E.B. *How Mammalian Cells Acquire Copper: An Essential but Potentially Toxic Metal*. Biophys J, 2016. **110**(1):7-13.
73. Barnes, N., Tsivkovskii, R., Tsivkovskaia, N. and Lutsenko, S. *The copper-transporting ATPases, menkes and wilson disease proteins, have distinct roles in adult and developing cerebellum*. J Biol Chem, 2005. **280**(10):9640-5.
74. Oakes, B.W., Danks, D.M. and Campbell, P.E. *Human copper deficiency: ultrastructural studies of the aorta and skin in a child with Menkes' syndrome*. Exp Mol Pathol, 1976. **25**(1):82-98.
75. Albahrani, A.A. and Greaves, R.F. *Fat-Soluble Vitamins: Clinical Indications and Current Challenges for Chromatographic Measurement*. Clin Biochem Rev, 2016. **37**(1):27-47.
76. Stephensen, C.B. *Vitamin A, infection, and immune function*. Annu Rev Nutr, 2001. **21**:167-92.
77. Holick, M.F. *Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease*. Am J Clin Nutr, 2004. **80**(6):1678S-88.
78. Plum, L.A. and DeLuca, H.F. *Vitamin D, disease and therapeutic opportunities*. Nat Rev Drug Discov, 2010. **9**(12):941-55.

79. Thakur, K., Tomar, S.K., Singh, A.K., Mandal, S. and Arora, S. *Riboflavin and health: A review of recent human research*. Crit Rev Food Sci Nutr, 2017. **57**(17):3650-3660.
80. Galimberti, F. and Mesinkovska, N.A. *Skin findings associated with nutritional deficiencies*. Cleve Clin J Med, 2016. **83**(10):731-739.
81. Yip, B., Chen, S.H., Mulder, H., Höppener, J.W. and Schachter, H. *Organization of the human beta-1,2-N-acetylglucosaminyltransferase I gene (MGAT1), which controls complex and hybrid N-glycan synthesis*. Biochem J, 1997. **321**:465-74.
82. De Koning, T.J. *Amino acid synthesis deficiencies*. Handb Clin Neurol, 2013. **113**:1775-83.
83. Cooper, A.J., Shurubor, Y.I., Dorai, T., Pinto, J.T., Isakova, E.P., Deryabina, Y.I., Denton, T.T. and Krasnikov, B.F.  *$\omega$ -Amidase: an underappreciated, but important enzyme in L-glutamine and L-asparagine metabolism; relevance to sulfur and nitrogen metabolism, tumor biology and hyperammonemic diseases*. Amino Acids, 2016. **48**(1):1-20.
84. Souba, W.W. and Pacitti, A.J. *How amino acids get into cells: mechanisms, models, menus, and mediators*. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 1992. **16**(6):569-78.
85. Matos, L., Gouveia, A.M. and Almeida, H. *ER Stress Response in Human Cellular Models of Senescence*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2015. **70**(8):924-35.
86. Suraweera, A., Münch, C., Hanssum, A. and Bertolotti, A. *Failure of amino acid homeostasis causes cell death following proteasome inhibition*. Mol Cell, 2012. **48**:242-53.
87. Poirier, Y., Antonenkov, V.D., Glumoff, T. and Hiltunen, J.K. *Peroxisomal beta-oxidation - a metabolic pathway with multiple functions*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1763**(12):1413-26.
88. Schultze, M.O. and Kuiken, K.A. *The effect of deficiencies in copper and iron on the catalase activity of rat tissues*. Journal of Biological Chemistry, 1941. **137**:727-734.
89. Davison, A.J., Kettle, A.J. and Fatur, D.J. *Mechanism of the inhibition of catalase by ascorbate. Roles of active oxygen species, copper and semidehydroascorbate*. J Biol Chem, 1986. **261**(3):1193-200.
90. Gaetke, L.M., Chow-Johnson, H.S. and Chow, C.K. *Copper: toxicological relevance and mechanisms*. Arch Toxicol, 2014. **88**(11):1929-38.

91. Vaz, F.M. and Wanders, R.J. *Carnitine biosynthesis in mammals*. Biochem J, 2002. **361**(3):417-29.
92. Kobayashi, D., Tamai, I., Sai, Y., Yoshida, K., Wakayama, T., Kido, Y., Nezu, J., Iseki, S. and Tsuji, A. *Transport of carnitine and acetylcarnitine by carnitine/organic cation transporter (OCTN) 2 and OCTN3 into epididymal spermatozoa*. Reproduction, 2007. **134**(5):651-8.
93. Violante, S., Ijlst, L., Te Brinke, H., Koster, J., Tavares de Almeida, I., Wanders, R.J., Ventura, F.V. and Houten, S.M. *Peroxisomes contribute to the acylcarnitine production when the carnitine shuttle is deficient*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1831**(9):1467-74.
94. Verhoeven, N.M. and Jakobs, C. *Human metabolism of phytanic acid and pristanic acid*. Prog Lipid Res, 2001. **40**(6):453-66.
95. Waterham, H.R., Ferdinandusse, S. and Wanders, R.J. *Human disorders of peroxisome metabolism and biogenesis*. Biochim Biophys Acta, 2016. **1863**(5):922-33.
96. Klouwer, F.C., Berendse, K., Ferdinandusse, S., Wanders, R.J., Engelen, M. and Poll-The, B.T. *Zellweger spectrum disorders: clinical overview and management approach*. Orphanet J Rare Dis, 2015. **10**:151.
97. Welte, M.A. and Gould, A.P. *Lipid droplet functions beyond energy storage*. Biochim Biophys Acta, 2017. **1388-1981**(17):30137-3.
98. Xu, S., Zhang, X. and Liu, P. *Lipid droplet proteins and metabolic diseases*. Biochim Biophys Acta, 2017. **0925-4439**(17):30245-4.
99. Nyasae, L.K., Schell, M.J. and Hubbard, A.L. *Copper directs ATP7B to the apical domain of hepatic cells via basolateral endosomes*. Traffic, 2014. **15**(12):1344-65.
100. Krishnamoorthy, L., Cotruvo, J.A. Jr., Chan, J., Kaluarachchi, H., Muchenditsi, A., Pendyala, V.S., Jia, S., Aron, A.T., Ackerman, C.M., Wal, M.N., Guan, T., Smaga, L.P., Farhi, S.L., New, E.J., Lutsenko, S. and Chang, C.J. *Copper regulates cyclic-AMP-dependent lipolysis*. Nat Chem Biol, 2016. **12**(8):586-92.
101. Kent, C. *Eukaryotic phospholipid biosynthesis*. Annu Rev Biochem, 1995. **64**:315-43.
102. Antonenkov, V.D. and Hiltunen, J.K. *Transfer of metabolites across the peroxisomal membrane*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1822**(9):1374-86.

103. Visser, W.F., van Roermund, C.W., Ijlst, L., Waterham, H.R. and Wanders, R.J. *Metabolite transport across the peroxisomal membrane*. Biochem J, 2007. **401**(2):365-75.
104. Cole, L.K., Vance, J.E. and Vance, D.E. *Phosphatidylcholine biosynthesis and lipoprotein metabolism*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1821**(5):754-61.
105. Best, C.H., Hershey, J.M. and Huntsman, M.E. *The effect of lecithine on fat deposition in the liver of the normal rat*. J Physiol, 1932. **75**(1):56–66.
106. Best, C.H., Ferguson, G.C. and Hershey, J.M. *Choline and liver fat in diabetic dogs*. J Physiol, 1933. **79**(1):94–102.
107. Zeisel, S.H. *A brief history of choline*. Ann Nutr Metab, 2012. **61**(3):254.
108. Li, Z., Agellon, L.B., Allen, T.M., Umeda, M., Jewell, L., Mason, A. and Vance, D.E. *The ratio of phosphatidylcholine to phosphatidylethanolamine influences membrane integrity and steatohepatitis*. Cell Metab, 2006. **3**(5):321–331.
109. Emoto, K., Kobayashi, T., Yamaji, A., Aizawa, H., Yahara, I., Inoue, K. and Umeda, M. *Redistribution of phosphatidylethanolamine at the cleavage furrow of dividing cells during cytokinesis*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1996. **93**(23):12867–72.
110. Rockenfeller, P., Koska, M., Pietrocola, F., Minois, N., Knittelfelder, O., Sica, V., Franz, J., Carmona-Gutierrez, D., Kroemer, G. and Madeo, F. *Phosphatidylethanolamine positively regulates autophagy and longevity*. Cell Death Differ, 2015. **22**(3):499-508.
111. Yang, S.T., Kreutzberger, A.J.B., Lee, J., Kiessling, V. and Tamm, L.K. *The role of cholesterol in membrane fusion*. Chem Phys Lipids, 2016. **199**:136-143.
112. Bentinger, M., Kania, M., Danikiewicz, W., Kaczorowska, E., Wojcik, J., Brismar, K., Dallner, G., Chojnacki, T., Swiezewska, E. and Tekle, M. *Effects of various squalene epoxides on coenzyme Q and cholesterol synthesis*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1841**(7):977-86.
113. Lew, B.L., Cho, Y., Kim, J., Sim, W.Y. and Kim, N.I. *Ceramides and cell signaling molecules in psoriatic epidermis: reduced levels of ceramides, PKC- $\alpha$ , and JNK*. J Korean Med Sci, 2006. **21**(1):95-9.
114. Bielawska, A., Linardic, C.M. and Hannun, Y.A. *Modulation of cell growth and differentiation by ceramide*. FEBS Lett, 1992. **307**(2):211-4.
115. Bernhard, W. *Lung surfactant: Function and composition in the context of development and respiratory physiology*. Ann Anat, 2016. **208**:146-150.

116. Braverman, N.E. and Moser, A.B. *Functions of plasmalogen lipids in health and disease*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1822**(9):1442-52.
117. Dean, J.M. and Lodhi, I.J. *Structural and functional roles of ether lipids*. Protein Cell, 2017. s13238-017-0423-5.



## 8. Anhang

### 8.1. Die relative Verteilung aller N-Glykanspezies

**Tab.8.1.: Relative Verteilung der gesamten N-Glykanspezies im Serum bestimmt durch MALDI-TOF-MS.** Die Glykankompositionen setzen sich zusammen aus Hexosen (H), N-Acetylhexosaminasen (N), Deoxyhexosen (Fukose; F), laktionierte 2,3-verknüpfte Sialinsäuren (L) und ethylesterifizierte 2,6-verknüpfte Sialinsäuren (E). Die Masse der Glykane sowie Mittelwerte der sechs Kontrollen, einschließlich Standardabweichung (STABWA) werden angegeben.

Glykan	Masse [M+Na]+	Patient	Kontrolle 1	Kontrolle 2	Kontrolle 3	Kontrolle 4	Kontrolle 5	Kontrolle 6	Mittelwert der Kontrollen	STABWA der Kontrollen
H5N2	1257,42	1,56%	0,48%	0,35%	0,38%	0,25%	0,25%	0,11%	0,34%	0,10%
H3N4	1339,48	0,14%	0,05%	0,06%	0,04%	0,03%	0,07%	0,07%	0,05%	0,02%
H6N2	1419,48	0,65%	0,69%	0,44%	0,62%	0,42%	0,52%	0,21%	0,54%	0,11%
H3N3E1	1455,52	0,09%	0,24%	0,21%	0,21%	0,23%	0,21%	0,44%	0,22%	0,02%
H3N4F1	1485,53	5,22%	1,25%	1,56%	0,99%	0,97%	2,13%	1,00%	1,38%	0,48%
H4N4	1501,53	0,29%	0,11%	0,11%	0,08%	0,08%	0,12%	0,15%	0,10%	0,02%
H3N5	1542,56	0,07%	0,01%	0,01%	0,02%	0,01%	0,02%	0,03%	0,01%	0,00%
H7N2	1581,53	0,50%	0,24%	0,12%	0,19%	0,14%	0,15%	0,11%	0,17%	0,05%
H4N3E1	1617,58	0,40%	0,42%	0,38%	0,36%	0,35%	0,30%	0,57%	0,36%	0,05%
H6N3	1622,55	0,17%	0,11%	0,06%	0,08%	0,04%	0,05%	0,04%	0,07%	0,03%
H4N4F1	1647,59	6,25%	2,59%	3,41%	1,21%	2,61%	5,08%	1,94%	2,98%	1,42%
H5N4	1663,58	0,27%	0,14%	0,12%	0,12%	0,11%	0,09%	0,14%	0,12%	0,02%
H3N5F1	1688,61	0,60%	0,28%	0,35%	0,27%	0,28%	0,58%	0,25%	0,35%	0,13%
H4N5	1704,61	0,14%	0,03%	0,05%	0,03%	0,04%	0,06%	0,09%	0,04%	0,01%
H8N2	1743,58	0,57%	0,41%	0,26%	0,38%	0,26%	0,30%	0,16%	0,32%	0,07%
H4N3F1E1	1763,63	0,09%	0,06%	0,06%	0,04%	0,05%	0,03%	0,08%	0,05%	0,01%
H4N4L1	1774,61	0,18%	0,08%	0,07%	0,07%	0,06%	0,05%	0,08%	0,07%	0,01%
H5N3E1	1779,63	0,45%	0,38%	0,29%	0,25%	0,21%	0,17%	0,10%	0,26%	0,08%
H5N4F1	1809,64	4,05%	2,03%	2,33%	0,93%	1,94%	2,55%	0,98%	1,96%	0,62%
H4N4E1	1820,66	2,06%	0,44%	0,35%	0,47%	0,29%	0,27%	0,35%	0,36%	0,09%
H4N5F1	1850,67	1,11%	0,46%	0,56%	0,40%	0,59%	1,12%	0,50%	0,63%	0,29%
H9N2	1905,63	0,71%	0,71%	0,59%	0,80%	0,66%	0,68%	0,35%	0,69%	0,08%
H5N4L1	1936,67	0,45%	0,43%	0,36%	0,44%	0,26%	0,23%	0,22%	0,34%	0,10%
H6N3E1	1941,68	0,52%	0,42%	0,35%	0,29%	0,26%	0,19%	0,11%	0,30%	0,09%
H4N4F1E1	1966,71	0,57%	0,25%	0,25%	0,21%	0,26%	0,35%	0,35%	0,27%	0,05%
H5N4E1	1982,71	8,27%	5,88%	5,66%	8,94%	6,30%	5,14%	6,52%	6,38%	1,49%
H5N5F1	2012,72	0,68%	0,34%	0,26%	0,27%	0,29%	0,40%	0,23%	0,31%	0,06%
H4N5E1	2023,73	0,07%	0,01%	0,02%	0,02%	0,02%	0,03%	0,11%	0,02%	0,01%
H5N4F1L1	2082,72	1,13%	0,77%	0,63%	0,57%	0,47%	0,46%	0,54%	0,58%	0,13%
H5N4F1E1	2128,77	6,21%	3,44%	2,94%	2,05%	2,58%	2,34%	1,81%	2,67%	0,54%
H4N5F1E1	2169,79	0,31%	0,16%	0,16%	0,12%	0,16%	0,22%	0,24%	0,16%	0,03%
H5N5E1	2185,79	0,39%	0,25%	0,26%	0,26%	0,25%	0,28%	0,41%	0,26%	0,01%
H5N4L2	2209,75	0,45%	0,38%	0,29%	0,31%	0,24%	0,23%	0,34%	0,29%	0,06%
H5N4E1L1	2255,79	7,00%	7,68%	7,28%	7,56%	5,62%	4,57%	4,61%	6,54%	1,38%
H5N4E2	2301,83	33,52%	45,56%	46,29%	46,69%	49,04%	44,70%	47,88%	46,45%	1,63%
H5N5F1E1	2331,85	1,21%	1,89%	1,40%	1,22%	1,83%	2,31%	1,72%	1,73%	0,43%
H6N5E1	2347,84	0,54%	0,44%	0,53%	0,91%	0,92%	0,68%	0,57%	0,70%	0,22%
H4N6F1E1	2372,87	0,59%	0,80%	1,39%	1,38%	0,46%	0,40%	0,41%	0,89%	0,48%
H5N4F1E1L1	2401,85	1,16%	2,07%	2,39%	1,23%	1,63%	1,33%	2,35%	1,73%	0,49%
H5N4F1E2	2447,89	1,62%	2,37%	3,92%	2,05%	2,45%	2,84%	3,21%	2,73%	0,72%
H6N5F1E1	2493,90	0,34%	0,31%	0,22%	0,17%	0,25%	0,24%	0,33%	0,24%	0,05%
H5N5E2	2504,91	0,30%	0,17%	0,25%	0,15%	0,17%	0,22%	0,24%	0,19%	0,04%
H6N5L2	2574,88	0,20%	0,15%	0,12%	0,13%	0,15%	0,16%	0,20%	0,14%	0,02%
H5N5F1E1L1	2604,93	0,07%	0,04%	0,05%	0,04%	0,04%	0,05%	0,12%	0,05%	0,01%
H6N5E1L1	2620,93	0,74%	0,58%	0,68%	1,44%	0,98%	0,86%	0,76%	0,91%	0,34%
H5N5F1E2	2650,97	0,36%	0,45%	0,70%	0,37%	0,63%	1,06%	1,36%	0,64%	0,27%
H6N5E2	2666,97	0,45%	0,26%	0,28%	0,61%	0,56%	0,57%	0,52%	0,46%	0,17%
H6N5F1L2	2720,94	0,20%	0,18%	0,15%	0,16%	0,11%	0,14%	0,19%	0,15%	0,03%
H6N5F1E1L1	2766,98	0,18%	0,20%	0,20%	0,16%	0,21%	0,19%	0,30%	0,19%	0,02%
H6N5F1E2	2813,02	0,15%	0,14%	0,14%	0,13%	0,15%	0,16%	0,21%	0,14%	0,01%
H6N5E1L2	2894,01	0,77%	1,11%	0,96%	1,31%	0,89%	0,86%	0,93%	1,03%	0,19%
H6N5E2L1	2940,05	3,04%	5,35%	4,21%	7,49%	5,76%	6,98%	6,09%	5,96%	1,31%
H6N5E3	2986,09	0,60%	1,17%	1,05%	1,60%	2,10%	2,19%	2,24%	1,62%	0,52%
H6N5F1E1L2	3040,07	0,18%	0,50%	0,50%	0,29%	0,41%	0,37%	0,53%	0,42%	0,09%
H6N5F1E2L1	3086,11	0,58%	2,60%	2,57%	1,08%	2,64%	2,31%	4,01%	2,24%	0,66%
H6N5F1E3	3132,15	0,06%	0,09%	0,09%	0,08%	0,15%	0,15%	0,19%	0,11%	0,03%
H6N5F2E1L2	3186,13	0,03%	0,12%	0,11%	0,02%	0,07%	0,06%	0,19%	0,08%	0,04%
H7N6E1L2	3259,14	0,20%	0,27%	0,19%	0,49%	0,35%	0,34%	0,36%	0,33%	0,11%
H7N6E2L1	3305,18	0,09%	0,13%	0,10%	0,19%	0,24%	0,21%	0,23%	0,17%	0,06%
H7N6F1E1L2	3405,20	0,04%	0,10%	0,09%	0,06%	0,13%	0,09%	0,16%	0,09%	0,03%
H7N6E1L3	3532,23	0,27%	0,60%	0,32%	0,61%	0,34%	0,34%	0,42%	0,44%	0,15%
H7N6E2L2	3578,27	0,16%	0,42%	0,27%	0,44%	0,46%	0,39%	0,46%	0,40%	0,07%
H7N6F1E1L3	3678,28	0,05%	0,24%	0,19%	0,08%	0,19%	0,14%	0,23%	0,17%	0,06%
H5N5	1866,66	0,15%	0,05%	0,05%	0,05%	0,04%	0,07%	0,06%	0,05%	0,01%
H6N4E1	2144,76	0,10%	0,07%	0,06%	0,05%	0,06%	0,05%	0,04%	0,06%	0,01%
H5N4F2E1	2274,82	0,22%	0,11%	0,12%	0,09%	0,11%	0,11%	0,06%	0,11%	0,01%
H6N5F1L3	2994,03	0,20%	0,23%	0,21%	0,23%	0,17%	0,19%	0,20%	0,21%	0,03%

## 8.2. *ATP6AP1*-cDNA

GGGGGCAACGGTCACCTGATCTGCGGCTGTCGAGGCCGCTGAGGCAGTGGAGGCTGA  
GGCTATGATGGCGGCCATGGCGACGGCTCGAGTGCGGATGGGGCCGCGGTGCGCCC  
AGGCGCTCTGGCGCATGCCGTGGCTGCCGGTGTGTTTTGTCGTTGGCGGCGGCGGCGG  
CGGCGGCAGCGGCGGAGCAGCAGGTCCCGCTGGTGCTGTGGTCGAGTGACCGGGAC  
TTGTGGGCTCCTGCGGCGGACACTCATGAAGGCCACATCACCAGCGACTTGACAGCTCT  
CTACCTACTTAGATCCCGCCCTGGAGCTGGGTCCCAGGAATGTGCTGCTGTTCTGCA  
GGACAAGCTGAGCATTGAGGATTTACAGCATATGGCGGTGTGTTTGAAACAAGCAG  
GACAGCGCCTTTTCTAACCTAGAGAATGCCCTGGACCTGGCCCCCTCCTCACTGGTGCT  
TCCTGCCGTCGACTGGTATGCAGTCAGCACTCTGACCACTTACCTGCAGGAGAAGCTC  
GGGGCCAGCCCCTTGATGTGGACCTGGCCACCCTGCGGGAGCTGAAGCTCAATGCC  
AGCCTCCCTGCTCTGCTGCTCATTGCGCTGCCCTACACAGCCAGCTCTGGTCTGATGG  
CACCCAGGGAAGTCCTCACAGGCAACGATGAGGTCATCGGGCAGGTCCTGAGCACACT  
CAAGTCCGAAGATGTCCCATACACAGCGGCCCTCACAGCGGTCCGCCCTTCCAGGGTG  
GCCCGTGATGTAGCCGTGGTGGCCGGAGGGCTAGGTCGCCAGCTGCTACAAAAACAG  
CCAGTATCACCTGTGATCCATCCTCCTGTGAGTTACAATGACACCGCTCCCCGGATCCT  
GTTCTGGGCCCCAAACTTCTCTGTGGCGTACAAGGACCAGTGGGAGGACCTGACTCCC  
CTCACCTTTGGGGTGCAGGAACCTAACCTGACTGGCTCCTTCTGGAATGACTCCTTTGC  
CAGGCTCTCACTGACCTATGAACGACTCTTTGGTACCACAGTGACATTCAAGTTCATTCT  
GGCCAACCGCCTCTACCCAGTGTCTGCCCGGCACTGGTTTACCATGGAGCGCCTCGAA  
GTCCACAGCAATGGCTCCGTGCGCTACTTCAATGCTTCCCAGGTCACAGGGCCCAGCA  
TCTACTCCTTCCACTGCGAGTATGTCAGCAGCCTGAGCAAGAAGGGTAGTCTCCTCGTG  
GCCCCGACGCAGCCCTCTCCCTGGCAGATGATGCTTCAGGACTTCCAGATCCAGGCTT  
TCAACGTAATGGGGGAGCAGTTCTCCTACGCCAGCGACTGTGCCAGCTTCTTCTCCCC  
CGGCATCTGGATGGGGCTGCTCACCTCCCTGTTTCATGCTCTTCACCTATGGCC  
TGCACATGATCCTCAGCCTCAAGACCATGGATCGCTTTGATGACCACAAGGGCCCCACT  
ATTTCTTTGACCCAGATTGTGTGACCCTGTGCCAGTGGGGGGGTTGAGGGTGGGACGG  
TGTCCGTGTTGTTGCTTTCCACCCCTGCAGCGCACTGGACTGAAGAGCTTCCCTCTTCC  
TACTGCAGCATGAACTGCAAGCTCCCCTCAGCCCATCTTGCTCCCTCTTCAGCCCGCTG  
AGGAGCTTTCTTGGGCTGCCCCCATCTCTCCCAACAAGGTGTACATATTCTGCGTAGAT  
GCTAGACCAACCAGCTTCCCAGGGTTCGTCGCTGTGAGGCGTAAGGGACATGAATTCT  
AGGGTCTCCTTTCTCCTTATTTATTCTTGTGGCTACATCATCCCTGGCTGTGGATAGTGC  
TTTTGTGTAGCAAATGCTCCCTCCTTAAGGTTATAGGGCTCCCTGAGTTTGGGAGTGTG  
GAAGTACTACTTAACTGTCTGTCCTGCTTGGCTGTCGTTATCGTTTTCTGGTGATGTTGT  
GCTAACAATAAGAAGTACACGGGTTTATTTCTGTGGCCTGAGAAGGAAGGGACCTCCAC  
GACAGGTGGGCTGGGTGCGATCGCCGGCTGTTTGGCATGTTCCCACCGGGAGTGCCG

GGCAGGAGCATGGGGTGCTTGGTTGTTTCCTTCCTAATAAAATAAACGCGGGTCGCCAT  
GC

**Abb.8.1.: Sequenz der humanen *ATP6AP1*-cDNA laut NCBI (RefSeq NM\_001183.5).** Markiert sind Start- und Stopcodon (grün) sowie die Mutation c.542T>G des Patienten (rot).

### 8.3. qRT-PCR Messwerte der Gene

**Tab.8.2.: Normalisierte Messwerte der qRT-PCR.**  $\Delta\Delta Ct$ - Mittelwerte der Zielgene und die Standardabweichung (STABWA) sowie der Student'sche t-Test.

	Patient			
Gen	Mittelwert	STABWA	t-Test	Signifikanz
<i>ATP6AP1</i>	0,57	0,12	0,14	
<i>MAN1B1</i>	0,69	0,20	0,17	
<i>SLC35A1</i>	0,53	0,23	0,05	
<i>SLC35A2</i>	0,54	0,20	0,04	*
<i>SLC35A3</i>	0,52	0,32	0,07	
<i>SLC35C1</i>	0,46	0,04	0,1	
<i>FUT4</i>	0,51	2,48	0,08	
<i>B4GALT1</i>	0,37	0,42	0,27	
<i>ST3Gal2</i>	0,17	0,06	0,46	
<i>SLC35D2</i>	2,44	0,45	0,22	
<i>SLC35B2</i>	0,42	0,57	0,2	
<i>SLC35B3</i>	0,47	0,45	0,03	*
<i>SLC35B4</i>	0,27	0,20	0,37	
<i>COG5</i>	0,92	0,11	0,07	

## 8.4. Messergebnisse aller detektierten Aminosäuren und Acylcarnitine im Serum und Fibroblasten

Tab.8.3.: Detektierte Aminosäure- und Acylcarnitinwerte im Serum des Patienten (n= 4) und der Kontrollen (n= 4). Angegeben sind ihre Mittelwerte, die Standardabweichung (STABWA) und der Student'sche t-Test.

	Mittelwert		STABWA			
Aminosäuren	Kontrolle	Patient	Kontrolle	Patient	t-Test	Signifikanz
Ala	191,2	235,3	51,6	12,2	0,074	
Pro	569,2	683,4	367,4	43,3	0,280	
Val	94,3	76,8	27,1	10,7	0,138	
Thr	76,5	146,2	35,5	11,2	0,005	**
Leu/Ile	91,8	118,0	41,9	14,3	0,141	
Gln	67,9	51,2	18,9	8,6	0,080	
Met	23,7	24,1	10,1	4,9	0,471	
His	787,5	691,1	476,5	190,6	0,360	
Phe	41,9	55,6	27,4	7,1	0,186	
Tyr	63,1	79,9	14,7	8,3	0,047	
Asp	254,2	67,6	392,6	10,3	0,189	
Glu	235,0	279,7	43,0	43,2	0,137	
Trp	67,5	86,6	13,6	22,3	0,097	
Gly	350,6	471,4	95,8	24,2	0,025	
Orn	107,8	148,1	39,6	9,1	0,047	
Arg	289,9	347,1	55,0	34,9	0,065	
Cit	35,6	33,7	8,2	1,6	0,329	
Hci	0,9	0,8	0,5	0,1	0,352	
Asa	0,4	0,1	0,7	0,0	0,191	

	Mittelwert		STABWA			
Acylcarnitine	Kontrolle	Patient	Kontrolle	Patient	t-Test	Signifikanz
C0	23,684	28,630	10,955	3,815	0,21	
C2	4,494	4,731	1,441	0,490	0,38	
C3	0,171	0,189	0,060	0,077	0,36	
C4	0,103	0,182	0,044	0,052	0,03	*
C5	0,076	0,089	0,031	0,039	0,32	
C6	0,060	0,089	0,048	0,035	0,18	
C8:1	0,111	0,120	0,061	0,018	0,40	
C8	0,117	0,102	0,031	0,024	0,23	
C10:1	0,195	0,205	0,080	0,090	0,44	
C10	0,129	0,108	0,040	0,040	0,24	
MMA	0,107	0,123	0,065	0,067	0,37	
Glut	0,127	0,156	0,040	0,082	0,28	
C12	0,051	0,087	0,021	0,033	0,06	
MeGlut	0,081	0,073	0,036	0,034	0,38	
3HMG	0,018	0,019	0,010	0,013	0,45	
C14:1	0,075	0,093	0,084	0,041	0,36	
C14	0,054	0,058	0,046	0,016	0,44	
C14OH	0,030	0,038	0,018	0,026	0,31	
C16:1	0,035	0,032	0,005	0,017	0,41	
C16	0,126	0,127	0,082	0,032	0,49	
C16:1OH	0,013	0,016	0,002	0,008	0,32	
C16OH	0,020	0,019	0,009	0,017	0,48	
C18:2	0,046	0,047	0,023	0,018	0,48	
C18:1	0,093	0,092	0,076	0,003	0,49	
C18	0,088	0,075	0,059	0,053	0,38	

**Tab.8.4.: Detektierte Aminosäure- und Acylcarnitinwerte im Fibroblastenlysat des Patienten (n= 4) und der Kontrollen (n= 5).** Angegeben sind ihre Mittelwerte, die Standardabweichung (STABWA) sowie der Student'sche t-Test.

	Mittelwert		STABWA		
Aminosäuren	Kontrolle	Patient	Kontrolle	Patient	t-Test
Ala	58,7	34,9	54,77	8,64	0,21
Pro	31,6	31,0	14,30	3,78	0,47
Val	45,6	40,6	26,93	3,07	0,36
Thr	11,3	8,1	6,98	1,76	0,21
Leu/Ile	18,6	14,6	11,39	1,45	0,26
Gln	23,8	21,9	13,16	1,85	0,39
Met	195,7	226,7	99,52	50,18	0,30
His	474,9	438,5	213,38	44,14	0,38
Phe	1,6	1,3	0,69	0,40	0,21
Tyr	52,7	49,1	23,95	4,96	0,39
Asp	319,5	207,8	165,50	18,91	0,11
Glu	88,3	80,5	57,29	9,38	0,40
Trp	75,0	81,1	27,23	5,18	0,34
Gly	109,9	107,9	48,17	2,17	0,47
Orn	4,8	3,5	4,47	0,94	0,30
Arg	98,9	70,5	89,91	13,59	0,28
Cit	0,6	0,4	0,41	0,04	0,15
Hci	0,3	0,2	0,23	0,04	0,14
Asa	0,4	0,2	0,38	0,04	0,14

	Mittelwert		STABWA		
Acylcarnitine	Kontrolle	Patient	Kontrolle	Patient	t-Test
C0	0,8216	0,2778	0,8254	0,0591	0,12
C2	2,7649	2,4166	1,5578	0,1704	0,34
C3	0,1042	0,0245	0,1302	0,0056	0,17
C4	0,0138	0,0043	0,0101	0,0002	0,08
C5:1	0,0105	0,0081	0,0086	0,0027	0,31
C5	0,0202	0,0056	0,0292	0,0013	0,18
C6	0,0111	0,0084	0,0065	0,0018	0,22
C5OH+HMB	0,0035	0,0041	0,0012	0,0006	0,24
C8:1	0,0057	0,0048	0,0021	0,0009	0,21
C8	0,0018	0,0024	0,0011	0,0017	0,30
C10:1	0,0083	0,0097	0,0036	0,0060	0,33
C10	0,0034	0,0035	0,0012	0,0007	0,42
MMA	0,0099	0,0055	0,0080	0,0019	0,16
Glut	0,0103	0,0129	0,0061	0,0038	0,25
C12	0,0025	0,0034	0,0021	0,0012	0,24
MeGlut	0,0056	0,0060	0,0024	0,0019	0,40
3HMG	0,0030	0,0050	0,0016	0,0033	0,14
C14:1	0,0026	0,0036	0,0021	0,0014	0,22
C14	0,0050	0,0053	0,0025	0,0023	0,44
C14OH	0,0029	0,0047	0,0018	0,0027	0,13
C16:1	0,0068	0,0122	0,0044	0,0048	0,06
C16	0,0027	0,0029	0,0018	0,0020	0,45
C16:1OH	0,0032	0,0037	0,0026	0,0028	0,41
C16OH	0,0029	0,0046	0,0017	0,0015	0,08
C18:2	0,0078	0,0074	0,0044	0,0028	0,45
C18:1	0,0035	0,0036	0,0031	0,0021	0,47
C18	0,0025	0,0041	0,0012	0,0014	0,05
C18:1OH	0,0025	0,0029	0,0011	0,0006	0,30
C18OH	0,0052	0,0051	0,0019	0,0025	0,46

## 8.5. Messergebnisse der detektierten Lipidspezies in Fibroblasten

Tab.8.5.: Messergebnisse der Lipidspezies aus Kontroll- (n = 3) und Patientenfibroblasten (n = 3). Die Mittelwerte, Standardabweichung (STABWA) und der Student'scher t-Test werde in [mol %] angegeben.

Lipide	Mittelwert		STABWA		t-Test	Signifikanz
	Kontrolle	Patient	Kontrolle	Patient		
CE	2,153	1,663	0,03	0,203	0,007	*
Chol	21,504	24,717	0,19	0,919	0,002	**
DAG	1,392	1,127	0,048	0,228	0,06	
PC	31,382	28,755	0,633	1,013	0,009	*
PC O-	5,288	6,173	0,074	0,628	0,036	*
PE	12,854	10,864	1,28	0,513	0,033	*
PE O-	1,81	1,953	0,199	0,055	0,148	
PE P-	7	6,458	2,106	0,608	0,345	
PI	3,337	3,928	0,28	0,248	0,026	*
PS	6,456	6,528	0,618	0,366	0,435	
SM	5,253	5,854	0,051	0,246	0,007	*
TAG	0,437	0,669	0,04	0,299	0,127	
Cer	0,258	0,357	0,021	0,019	0,002	**
HexCer	0,175	0,126	0,012	0,01	0,003	**
PA	0,063	0,057	0,008	0,005	0,14	
PG	0,119	0,221	0,03	0,088	0,065	
PG O-	0,007	0,013	0,003	0,007	0,133	
PI O-	0,098	0,121	0,01	0,008	0,016	*
PS O-	0,411	0,414	0,036	0,041	0,46	

Spezies	Mittelwert		STABWA		t-Test	Signifikanz
	Kontrolle	Patient	Kontrolle	Patient		
P-18:0/16:1	0,71	0,805	0,158	0,233	0,295	
P-18:0/18:1	6,207	11,179	0,817	1,158	0,002	**
P-18:0/18:2	0,644	0,802	0,022	0,039	0,008	*
P-18:0/20:3	2,507	3,179	0,101	0,704	0,089	
P-18:0/20:4	33,933	40,26	1,137	2,704	0,01	*
P-18:0/20:5	2,746	2,85	0,629	0,691	0,428	
P-18:0/22:2	0,998	1,227	0,629	0,456	0,319	
P-18:0/22:3	1,416	2,622	0,087	0,743	0,075	
P-18:0/22:4	11,097	16,477	1,463	0,037	0,002	**
P-18:0/22:5	20,415	10,543	0,176	1,124	0,0001	***



	Mittelwert		STABWA		t-Test	Signifikanz
Spezies	Kontrolle	Patient	Kontrolle	Patient		
P-16:0/16:1	0,404	0,655	0,033	0,142	0,022	*
P-16:0/18:1	10,084	21,228	0,45	2,321	0,001	***
P-16:0/18:2	0,535	0,641	0,048	0,227	0,279	
P-16:0/20:3	0,824	0,875	0,077	0,165	0,282	
P-16:0/20:4	29,482	32,613	0,657	0,922	0,007	*
P-16:0/20:5	1,886	2,306	0,385	0,459	0,294	
P-16:0/22:3	0,583	1,608	0,453	0,344	0,04	*
P-16:0/22:4	10,235	17,942	0,242	0,845	0,0001	***
P-16:0/22:5	23,726	11,079	0,727	1,138	0,00005	***
P-16:0/22:6	21,831	10,562	0,704	1,488	0,0002	***

	Mittelwert		STABWA		t-Test	Signifikanz
Cholesterylester	Kontrolle	Patient	Kontrolle	Patient		
CE-14:0	1,236	1,335	0,045	0,308	0,306	
CE-14:1	0,126	0,349	0,115	0,176	0,07	
CE-15:0	1,178	1,192	0,166	0,251	0,468	
CE-16:0	8,03	13,071	1,671	0,822	0,005	**
CE-16:1	5,441	7,515	1,205	0,552	0,027	*
CE-16:2	0,287	0,413	0,056	0,051	0,022	*
CE-17:0	1,94	2,204	0,281	0,235	0,139	
CE-17:1	1,924	2,389	0,348	0,135	0,049	*
CE-18:1	25,859	27,944	1,986	1,117	0,094	
CE-18:2	4,461	5,245	0,673	0,068	0,058	
CE-18:3	0,733	0,912	0,099	0,097	0,045	*
CE-19:1	0,706	0,768	0,066	0,037	0,114	
CE-20:1	1,357	1,115	0,1	0,062	0,012	*
CE-20:2	1,664	1,28	0,166	0,188	0,028	*
CE-20:3	8,269	6,977	2,184	0,315	0,184	
CE-20:4	14,85	13,985	3,119	0,578	0,331	
CE-22:5	11,803	6,827	1,47	0,938	0,004	**
CE-22:6	10,136	6,478	0,544	0,446	0,0004	***

## Publikationsliste

### Eingereicht:

*SCYL1 mutations cause low  $\gamma$ -glutamyl-transferase cholestasis, acute liver failure and neurodegeneration (CALFAN) syndrome.*

Dominic Lenz, Patricia McClean, Aydan Kansu, Penelope E. Bonnen, Christian Thiel, Beate K. Straub, Inga Harting, Bader Alhaddad, Bianca Dimitrov, Urania Kotzaeridou, Daniel Wenning, Ryan W. Himes, Zarife Kuloğlu, Emma L. Blakely, Robert W. Taylor, Thomas Meitinger, Stefan Kölker, Holger Prokisch, Georg F. Hoffmann, Tobias B. Haack, Christian Staufner

*Cutis laxa, exocrine pancreas insufficiency, diminished amino acids and accumulation of medium and long-chain acylcarnitines in combination with altered lipid homeostasis as additional symptoms in a new patient with ATP6AP1-CDG.*

Bianca Dimitrov, Nastassja Himmelreich, Agnes L. Hipgrave Ederveen, Christian Lüchtenborg, Jürgen G. Okun, Maximilian Breuer, Anna-Marlen Hutter, Matthias Carl, Luca Guglielmi, Andrea Hellwig, Kai Christian Thiemann, Markus Jost, Verena Peters, Christian Staufner, Georg F. Hoffmann, Annette Hackenberg, Nagarajan Paramasivam, Stefan Wiemann, Roland Eils, Matthias Schlesner, Sabine Strahl, Britta Brügger, Manfred Wuhler, G. Christoph Korenke, Christian Thiel

## Konferenzteilnahme

*23. November 2012:* 24th Joint Glycobiology Meeting, Leucorea, Lutherstadt Wittenberg

### **Vortrag**

*24. November 2013:* 24th Joint Glycobiology Meeting, Leucorea, Lutherstadt Wittenberg

### **Posterpräsentation**

*10. Februar 2014:* EURO-CDG Meeting, Université Paris Descartes, Paris, France

### **Vortrag**

*6. März 2014:* 28. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft für Pädiatrische Stoffwechselstörungen, Maritim, Fulda

### **Posterpräsentation**

*1. September 2014:* Euro-CDG Meeting, Innsbruck, Austria

### **Vortrag**

*25. März 2015:* EURO-CDG & TREATCDG meeting on Congenital Disorders of Glycosylation, Madrid, Spain

### **Vortrag**

*25. Oktober 2015:* 26th Joint Glycobiology Meeting (JGM), France

### **Posterpräsentation**

*9. März 2017:* APS Annual Meeting, Fulda, Germany

### **Posterpräsentation**

*13. Juli 2017:* International Scientific CDG Symposium, Irish College, Leuven, Belgium

### **Vortrag**

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Christian Körner, der leider am 2. Februar 2015 viel zu früh verstarb, für die Möglichkeit zur Durchführung dieser Arbeit in seiner Gruppe bedanken sowie für sein Vertrauen, sein Engagement und vor allem die Einführung in die sehr interessante Thematik der CDG. Mein Dank geht ebenso an Prof. Dr. Sabine Strahl, die nach Christian Körners Tod, die Aufgabe des Erstgutachters übernahm und mich mit ihrem weitreichenden Wissen im Bereich der Glykoproteinbiochemie unterstützte.

Bei Herrn Prof. Dr. Stephan Frings möchte ich mich für die bereitwillige Übernahme der Funktion als Drittgutachter und die wissenschaftlichen Diskussionen während des „TAC-Meetings“ bedanken.

Mein ganz besonderer Dank geht an meinen Zweitgutachter, aber auch zugleich Betreuer, Dr. Christian Thiel, welcher nicht nur verantwortlich war für ein wissenschaftlich anspruchsvolles, hilfsbereites, angenehmes und auch freundliches Arbeitsklima, sondern mich durch seinen Forschergeist mitriss sowie tatkräftig unterstützte und trotz mancher, kleiner „Fehlritte“ meinerseits weiterhin an mich glaubte und mir vertraute.

Auch ein großes Dankeschön schenke ich meinen Arbeitskollegen, welche zum Teil auch zu Freunden wurden, mir wissenschaftlich und technisch mit Rat und Tat zur Seite standen, aber auch eine besondere Arbeitsatmosphäre schufen, zu welcher man immer wieder gerne zurückkehren wollte. Hiermit bedanke mich bei Nastassja Himmelreich, Virginia Geiger, Markus Jost, Kai Thiemann, Diana Popovici, Dorothea Messner-Schmitt, Bei-Tzu Wang und Tim Weigand sowie Kristina Klingbeil, Sonja Exner und Maximilian Breuer. Auch danke ich den „Frischlingen“ unserer Arbeitsgruppe Marlen Hutter für das Korrekturlesen und Nils Glücklich.

Ich danke auch Dr. Jürgen Okun, Kathrin Schmidt sowie Dr. Britta Brügger für die hervorragende labortechnische Unterstützung.

Nicht nur in den Jahren der Promotion, sondern auch während des gesamten Studiums, konnte ich mich immer auf den vollen Rückhalt meiner Mutter verlassen. Durch ihre Unterstützung erreichte ich mein Ziel und dafür von Herzen vielen Dank, Mama!